

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie,
Direktor: Herr Prof. Dr. Dr. Johannes Thome

Mesenchymale Stammzellen und ihr Differenzierungspotential

**- Untersuchungen von *in vitro* Wachstumsbedingungen
zur Anreicherung mesenchymaler Subpopulationen -**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizinwissenschaften
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Diplom Biochemikerin Marlen Gottschalk geb. Schumann
geb. am 28.03.1983 in Magdeburg
aus Magdeburg

Rostock, den 27.10.2014

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. Aurel Popa-Wagner

Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Klaus G. Reymann

Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. (DZNE), Magdeburg

3. Gutachter

Prof. Dr. Gerburg Keilhoff

Institut für Biochemie und Zellbiologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Datum der Einreichung: 21.11.2014

Datum der Verteidigung: 05.04.2016

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Eigenschaften von Stammzellen.....	1
1.2 Subtypen der Stammzellen.....	2
1.2.1 Embryonale Stammzellen	2
1.2.2 Adulte Stammzellen	3
1.2.2.1 Neurale Stammzellen	4
1.2.2.2 Neurosphärulen – Der Nachweis neuraler Stammzellen	6
1.2.2.3 Mesenchymale Knochenmarkstammzellen.....	8
1.3 Plastizität	8
1.4 Induzierte pluripotente Stammzellen	10
1.5 Experimenteller Einsatz von Stammzellen	11
1.5.1 Tissue Engineering	11
1.5.2 Neurodegenerative Erkrankungen.....	12
1.6 Gegenstand der vorliegenden Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Geräte und Instrumente	15
2.1.2 Chemikalien und Substanzen	17
2.1.3 Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	17
2.1.4 Puffer und Lösungen	20
2.1.5 Antikörper	21
2.1.5.1 Primärantikörper	21
2.1.5.2 Sekundärantikörper	21
2.1.5.3 Fluorochrome der Sekundärantikörper	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	22
2.2.2 Isolierung und Kultivierung der Knochenmarkstammzellen	22
2.2.3 Kryokonservierung und Revitalisierung der Knochenmarkstammzellen	23
2.2.4 Passagierung der Knochenmarkstammzellen.....	23
2.2.5 Kultivierung und Passagierung humaner mesenchymaler Stammzellen	24
2.2.6 Beschichtung von Zellkulturflaschen und Deckgläschen mit Matrigel	24
2.2.7 BrdU-Inkorporations-Assay	25

2.2.8	Induktion von Neurosphärulen-ähnlichen Strukturen aus MSZ.....	25
2.2.9	Serumdeprivation	25
2.2.10	Neurogene Differenzierung adhärent wachsender MSZ	26
2.2.11	Präparation neuronaler Primärkulturzellen	26
2.2.12	Kokultivierung von Primärkulturzellen und rMSZ	27
2.2.13	Immunchemische Färbungen	28
2.2.13.1	Immunzytochemie.....	28
2.2.13.2	Anti-Bromdesoxyuridin-Färbung.....	29
2.2.14	RNS Extraktion und qRT-PCR Analyse	29
2.2.15	Auswertung	32
2.2.15.1	Mikroskopie	32
2.2.15.2	<i>Time-Lapse</i> -Mikroskopie	32
2.2.15.3	Statistische Analyse	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Kultivierung von Knochenmarkstammzellen aus der Ratte.....	33
3.2	Kultivierung von humanen mesenchymalen Knochenmarkstammzellen	35
3.3	Induktion von Neurosphärulen aus rMSZ, hMSZ und embryonalen Primärkulturzellen.....	37
3.4	Expression neuroektodermaler Marker in basalen rMSZ	39
3.5	Expression neuroektodermaler Marker in basalen hMSZ.....	40
3.6	Expression neuroektodermaler Marker in basalen embryonalen PKZ	41
3.7	Expression neuroektodermaler Marker in basalen rMSZ-Neurosphärulen	43
3.8	Expression neuroektodermaler Marker in basalen hMSZ-Neurosphärulen.....	44
3.9	Expression neuroektodermaler Marker in basalen E18-Neurosphärulen.....	45
3.10	Neuronale Differenzierung der MSZ unter adhärennten Kulturbedingungen	47
3.10.1	Neuronale Differenzierung von MSZ der Ratte	47
3.10.2	Neuronale Differenzierung von MSZ humanen Ursprungs	49
3.10.3	Neuroektodermale Marker in neuronal differenzierten rMSZ	52
3.10.4	Neuroektodermale Marker in neuronal differenzierten hMSZ.....	54
3.11	<i>Time-Lapse</i> -Mikroskopie der rMSZ	56
3.11.1	Basale adhärennte Kultivierungsperiode.....	56
3.11.2	Kultivierungsperiode mit NDM CET	57
3.11.3	Kultivierungsperiode mit NDM PC	58
3.12	<i>Time-Lapse</i> -Mikroskopie von hMSZ.....	59

3.12.1	Basale adhärenzte Kulturbedingungen.....	59
3.12.2	Kultivierung mit NDM CET	60
3.12.3	Kultivierung mit NDM PC	61
3.13	Einfluss der NDM auf rMSZ unter nicht-adhärenzten Kulturbedingungen	62
3.14	<i>Time-Lapse</i> -Mikroskopie von rMSZ-Sphärulen	67
3.14.1	rMSZ-Sphärulen unter basalen Kulturbedingungen	67
3.14.2	rMSZ-Sphärulen mit NDM CET.....	69
3.15	Ko-Kultivierung von rMSZ mit kortikalen Primärkulturen.....	70
3.16	Seltene spontane neuronale Differenzierung von rMSZ nach Sphäruleninduktion...	74
3.17	Einfluss verschiedener Medien auf die Expression ausgewählter Proteine auf Genebene.....	78
4	Diskussion	81
4.1	Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen aus der Ratte.....	82
4.2	Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen	83
4.3	Neurosphärulen-Induktion aus Knochenmarkstammzellen	84
4.4	Auswirkungen der neurogenen Differenzierungsmedien unter adhärenzten Kulturbedingungen.....	86
4.5	Auswirkungen der neurogenen Differenzierungsmedien unter nicht-adhärenzten Kulturbedingungen.....	92
4.6	Differenzierung der rMSZ in Ko-Kultur in neurale Zelltypen.....	94
4.7	Neuronale Differenzierung von MSZ aus der Ratte	97
5	Zusammenfassung.....	100
6	Abstract.....	102
7	Literaturverzeichnis.....	104
8	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
9	Abbildungsverzeichnis	VI
10	Publikationen	VIII
11	Selbstständigkeitserklärung	IX

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Eigenschaften von Stammzellen

Als Stammzellen werden allgemein Zellen bezeichnet, die gänzlich unspezialisiert sind. Die zwei ausschlaggebenden Eigenschaften von Stammzellen sind zum einen ihre Fähigkeit sich durch Zellteilung selbst zu erneuern (engl. *self-renewal*) und zum anderen ihr Potenzial in reifere Nachkommen zu differenzieren.

Die Zellteilung von Stammzellen kann über zwei unterschiedliche Mechanismen ablaufen, die symmetrische und die unsymmetrische Zellteilung (Abbildung 1.1). Unter der unsymmetrischen Zellteilung versteht man die Bildung einer Stammzelle und einer determinierten Vorläuferzelle. Diese kann durch weitere Zellteilungen in eine reife Zelle ausdifferenzieren. Bei der symmetrischen Teilung entstehen zwei identische Nachkommen. Entweder handelt es sich dabei um zwei Stammzellen oder zwei Vorläuferzellen. Somit sind Stammzellen in der Lage, Gewebe zu bilden, es zu erhalten oder gar zu erneuern.

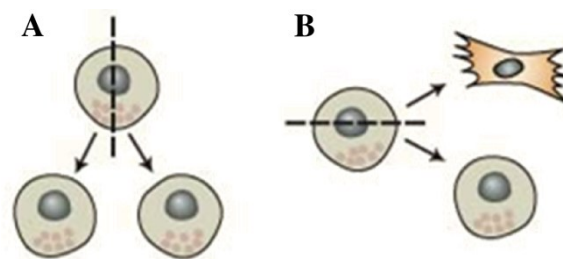


Abbildung 1.1: Stammzellen können sich auf zwei Arten teilen.

(A) symmetrische Teilung: Es entstehen zwei identische Nachkommen (zwei Stammzellen oder zwei Vorläuferzellen). (B) unsymmetrische Zellteilung: Es entstehen eine Stammzelle und eine determinierte Vorläuferzelle. (Abbildung bearbeitet nach http://www.wissensschau.de/images/stammzellen/stammzellen_teilung.jpg, Stand 16.09.2014)

Eine Unterscheidung von Stammzellen kann aufgrund ihres ontogenetischen Alters erfolgen. Embryonale Stammzellen sind ontogenetisch gesehen die frühesten Stammzellen. Sie entstehen bereits nach den ersten Zellteilungen. Aus den embryonalen Stammzellen entwickeln sich alle anderen Stammzellen.

Geläufiger ist jedoch die Unterscheidung basierend auf ihrem Differenzierungspotenzial. Der Grad der Differenzierungsfähigkeit einer Stammzelle wird als Potenz bezeichnet. Als totipotent (lat. *totus* = ganz, lat. *potens* = fähig) werden nur die befruchtete Eizelle und Zellen der Morula (bis max. zum 8-Zellstadium) angesehen. Totipotente Stammzellen können in alle Zelltypen eines Organismus differenzieren. Während der Embryonalentwicklung entsteht aus

diesen Zellen die Blastozyste, die sich aus der inneren Zellmasse (Embryoblast) und der äußeren Zellmasse (Trophoblast) zusammensetzt. Die sogenannten pluripotenten (lat. *plures* = Mehrzahl) Stammzellen lassen sich aus dem Embryoblasten gewinnen. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie in jeden embryonalen Zelltyp, also Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm, Mesoderm), ausdifferenzieren können. Dies sind die bereits erwähnten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). Im weiteren Verlauf der Ontogenese entwickeln sich aus den ES-Zellen fötale, neonatale und adulte Stammzellen, die unter dem Begriff postembryonale Stammzellen zusammengefasst werden. Die postembryonalen Stammzellen werden als multipotent (lat. *multi* = viele) definiert, da sie ein geringeres Differenzierungspotenzial aufweisen. Sie differenzieren nur noch in die Zelltypen des Keimblattes, in denen sie vorkommen. Aus adulten Stammzellen des Ektoderms entwickeln sich z. B. neurale Zellen und Hautzellen.

Des Weiteren gibt es die oligopotenten (lat. *oligo* = wenig) Stammzellen, die nur in wenige Abkömmlinge innerhalb eines Gewebetyps differenzieren (z. B. lymphoide Stammzellen), und die unipotenten (lat. *unus* = einzig) Stammzellen, die nur reife Zellen desselben Typs bilden können (z. B. Muskelstammzellen).

Die Möglichkeit in eine Vielzahl von gewebstypischen Zellen zu differenzieren, macht das große Potenzial der Stammzellen für den therapeutischen Einsatz z. B. in der Zellersatztherapie, Geweberekonstruktion und Gentherapie aus.

1.2 Subtypen der Stammzellen

1.2.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus: (1) sie sind in Zellkultur unbegrenzt teilungsfähig, (2) ihre Chromosomenzahl bleibt stabil und (3) sie können in alle Gewebe des Körpers differenzieren (Pluripotenz).

Zum ersten Mal wurden ES-Zellen 1981 aus Zellen der inneren Zellmasse muriner Blastozysten isoliert (Evans und Kaufmann, 1981; Martin, 1981). Erst 17 Jahre später gelang es, humane ES-Zellen zu gewinnen (Thomson et al., 1998). Die Verwendung humaner ES-Zellen spielt sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die klinische Forschung eine große Rolle. Mithilfe dieser Zellen können *in vitro* Modelle entwickelt werden, um neurodegenerative Erkrankungen oder auch neuroprotektive bzw. neurotoxische Substanzen zu untersuchen.

Große Hoffnungen setzt man auf die Möglichkeit, humane ES-Zellen als unerschöpfliche Quelle für Gewebe einzusetzen, die nur ein geringes oder gar kein Regenerationspotenzial aufweisen, wie zum Beispiel neurale Zellen. Die für diese Anwendung nötige Eigenschaft der ES-Zellen, in alle Zelltypen aller drei Keimblätter zu differenzieren, stellt jedoch zugleich auch deren größten Nachteil dar. In Tierversuchen wurde festgestellt, dass die noch undifferenzierten ES-Zellen nach einer *in vivo* Transplantation zur Teratombildung neigen. Dies kann nur verhindert werden, indem hoch aufgereinigte Zellpräparate eingesetzt werden, die frei von undifferenzierten ES-Zellen sind und die sich im großen Maßstab herstellen lassen.

In Deutschland wird der Umgang mit humanen embryonalen Stammzellen durch das Embryonenschutzgesetz und das Stammzellgesetz geregelt. Das Embryonenschutzgesetz verbietet die Erzeugung humaner ES-Zellen, da sie zwangsläufig die Tötung des Embryos nach sich zieht. Allerdings wurde mit dem Stammzellgesetz (StZG vom 28.06.2002, BGB I, S. 2277, § 4 Abs. 2 Nr. 1 Buchstabe a) festgelegt, dass das Arbeiten mit importierten humanen ES-Zelllinien, die vor dem 01. Januar 2002 gewonnen wurden, gestattet ist. Dieser Stichtag wurde mittlerweile auf den 01. Mai 2007 verschoben.

1.2.2 Adulte Stammzellen

Die zweite wichtige Gruppe von Stammzellen sind die adulten Stammzellen. Diese auch als somatische Stammzellen bezeichneten multipotenten Stammzellen behalten ein Leben lang ihre Teilungs- und Differenzierungsfähigkeit und ermöglichen dadurch die Aufrechterhaltung der Organintegrität und die Regeneration von Gewebe im postnatalen Organismus. Adulte Stammzellen wurden inzwischen in vielen verschiedenen Geweben und Organen nachgewiesen, z. B. im Knochenmark (Spangrude et al., 1988), im Gehirn (Reynolds und Weiss, 1992), in der Leber (Thorgeirsson et al., 1993), in der Epidermis (Taylor et al., 2000) und im Fettgewebe (Zuk et al., 2001). Die Vorteile der adulten Stammzellen gegenüber den embryonalen Stammzellen liegen klar auf der Hand: Die Gewinnung der adulten Stammzellen ruft keine ethischen Bedenken hervor, die Zellen sind in Kultur gut expandierbar und es besteht keine Gefahr einer Abstoßungsreaktion, da die adulten Stammzellen autolog verwendet werden können.

In den folgenden Abschnitten soll genauer auf die Subtypen der adulten Stammzellen eingegangen werden.

1.2.2.1 Neurale Stammzellen

Bis in den frühen 1990er Jahren galten die Existenz neuraler Stammzellen (NSZ) und das Stattfinden einer Neurogenese im menschlichen erwachsenen Gehirn als ausgeschlossen. Erste Hinweise auf die Bildung neuer Nervenzellen im adulten Gehirn gab es jedoch bereits schon früher bei Nagetieren (Altman, 1962; Altman und Das, 1965) und auch bei Singvögeln (Goldman und Nottebohm, 1983).

Neurale Stammzellen sind charakterisiert durch die Eigenschaften der Selbsterneuerung und der Multipotenz. Dadurch sind sie in der Lage, in die drei Hauptzelltypen des zentralen Nervensystems (Astrozyten, Neurone, Oligodendrozyten) zu differenzieren (Abbildung 1.2).

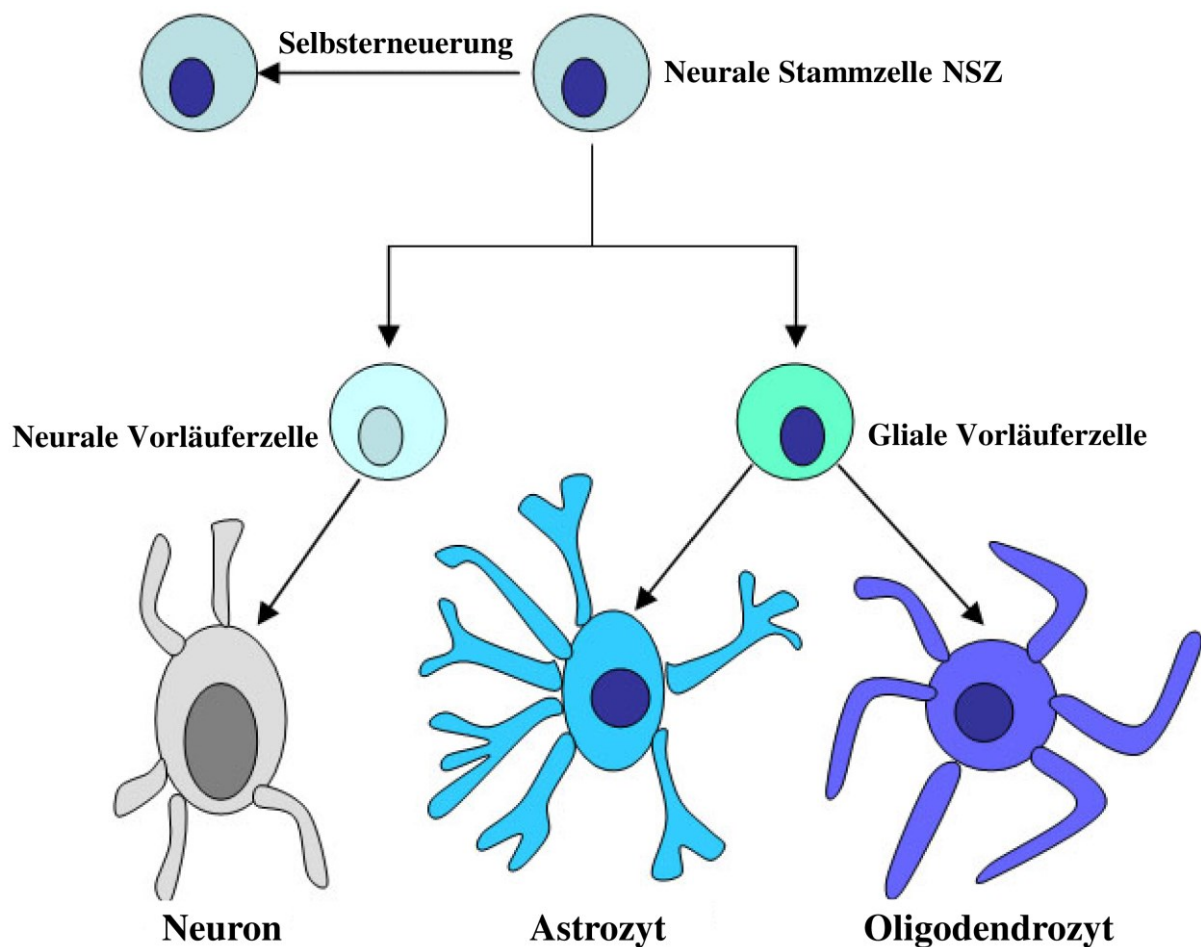


Abbildung 1.2: Differenzierung neuraler Stammzellen.

Während der Neurogenese differenzieren die neuralen Stammzellen in die drei Hauptzelltypen des ZNS: Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten. Dabei entstehen die Astrozyten und Oligodendrozyten aus glialen Vorläuferzellen und die Neurone aus neuronalen Vorläuferzellen. (Abbildung bearbeitet nach <http://njms.umdnj.edu/gsbs/stemcell/scofthemonth/scofthemonth2/braincancer/2.jpg>, Stand 16.06.2012)

Im adulten Säugerhirn gibt es zwei Zonen, in denen Neurogenese stattfinden kann: die Subventrikulärzone (SVZ) in der Wand der lateralen Ventrikel und die Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus im Hippokampus (Buga et al., 2011) (Abbildung 1.3). In der SVZ werden aus NSZ bzw. Vorläuferzellen neue Neurone gebildet. Bis zu 30.000 neue Zellen migrieren pro Tag über den rostralen migratorischen Strom (RMS) zum Bulbus olfactorius (Alvarez-Buylla et al., 2001). In der SGZ im Rattenhirn werden pro Tag nur 9.000 neue Zellen gebildet, die in die nahegelegene Granularschicht migrieren und dort zu Körnerzellen differenzieren (Cameron und McKay, 2001).

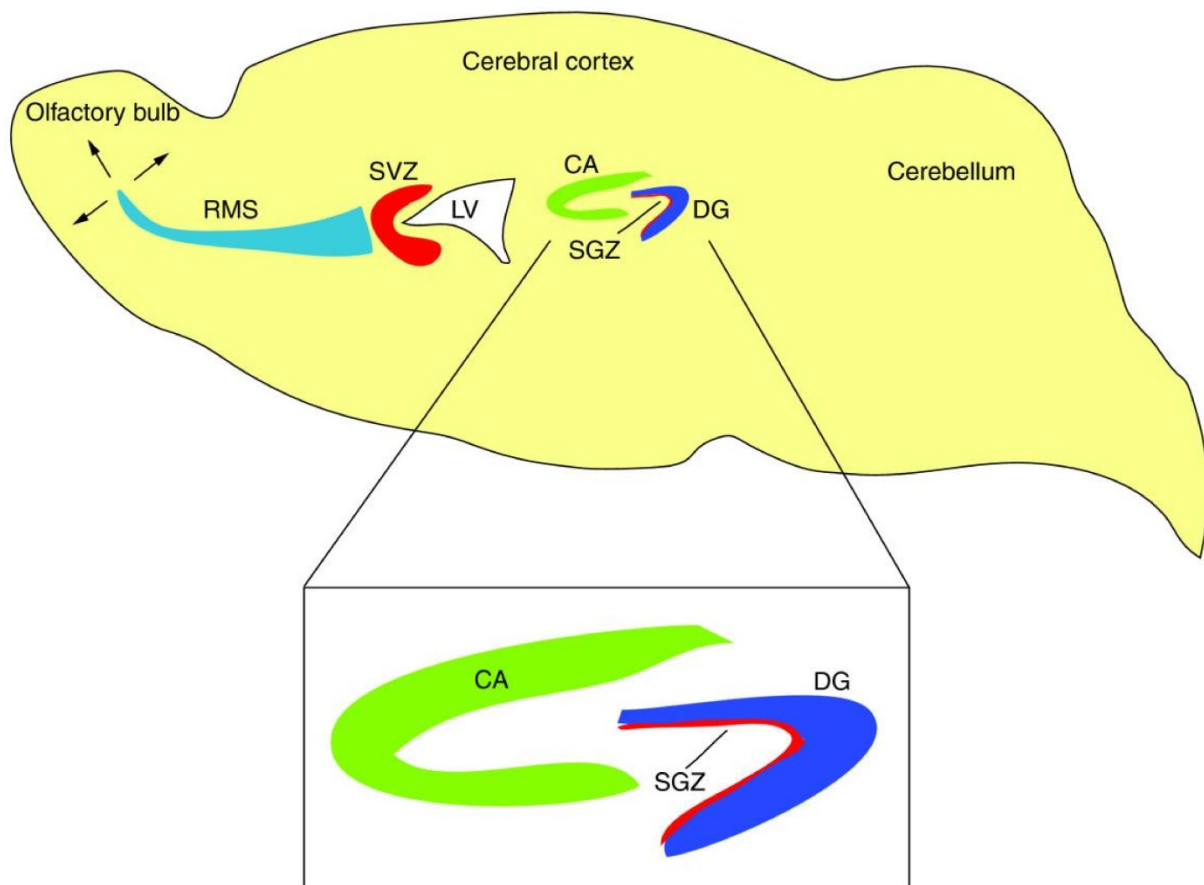


Abbildung 1.3: Zonen der Neurogenese im adulten Säugerhirn.

Neurogenese findet zum einen in der Subventrikulärzone (SVZ) der lateralen Ventrikel (LV) statt. Die hier entstandenen Neurone migrieren über den rostralen migratorischen Strom (RMS) zum Bulbus olfactorius. Zum anderen erfolgt die Neurogenese im Hippokampus, genauer gesagt in der Subgranulärzone (SGZ) (Pozniak und Pleasure, 2006)

1.2.2.2 Neurosphärulen – Der Nachweis neuraler Stammzellen

Bis heute gibt es keine eindeutigen Stammzellmarker, um neurale Stammzellen *in vitro* oder *in vivo* zweifelsfrei identifizieren zu können. Allerdings gelang es Reynolds und Weiss 1992 ein Protokoll zu etablieren, mit dem neurale Stammzellen *in vitro* leicht nachweisbar sind (Reynolds und Weiss, 1992). Frisch isolierte Zellen aus dem Gehirn werden unter nicht-adhärenenten und serumfreien Bedingungen in Gegenwart von zwei Wachstumsfaktoren, EGF und FGF, kultiviert. Der größte Teil der Zellen stirbt ab. Die wenigen Zellen, die überleben ($< 0,1\%$), beginnen stark zu proliferieren. Auf diese Weise entstehen aus der Suspension von Einzelzellen frei schwimmende Zellaggregate – die Neurosphärulen. Werden diese Neurosphärulen nun unter adhärenenten Bedingungen und ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren weiterkultiviert, so differenzieren die Zellen in Astrozyten, Neurone und Oligodendrozyten (Abbildung 1.4). Der Nachteil dieses Protokolls liegt jedoch darin, dass es sich nur um eine retrospektive Identifizierung handelt. Die initiale Zelle kann erst nach der Neurosphärulenbildung als neurale Stammzelle identifiziert werden.

Während zum Beispiel hämatopoetische Stammzellen Oberflächenmarker zu deren Identifizierung besitzen, ist es schwierig, NSZ vorausblickend zu identifizieren, da diese keine charakteristischen Oberflächen-Antigene aufweisen. Marker, wie Musashi I, Nestin oder SOX1, werden zwar selektiv von den NSZ exprimiert, jedoch ausschließlich intrazellulär und sind somit für eine FACS-Analyse (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung) nicht geeignet.

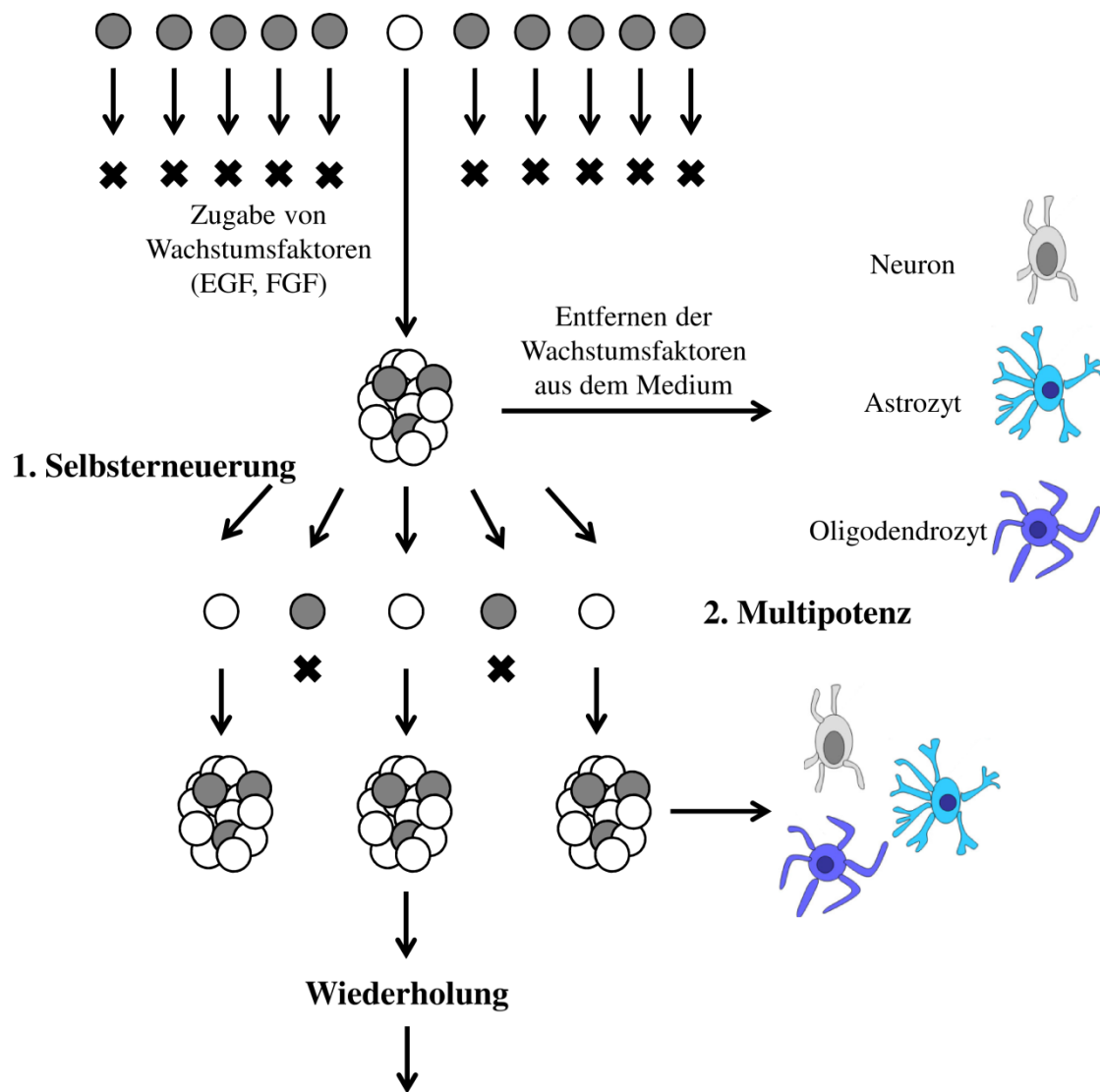


Abbildung 1.4: *in vitro* Assay der Neurosphäulenbildung.

Neurosphäulen entstehen aus einer Suspension dissoziierter Zellen unter serumfreien Bedingungen in Gegenwart der Wachstumsfaktoren EGF und FGF. Die Neurosphäulen sind zum einen in der Lage sich selbst zu erneuern, indem sie nach Dissoziation wiederum Neurosphäulen generieren. Zum anderen können sie unter adhärenenten Kulturbedingungen und durch Entfernen der Wachstumsfaktoren aus dem Medium in die drei Hauptzellen des ZNS differenzieren. (Abbildung bearbeitet nach Okano, 2002)

1.2.2.3 Mesenchymale Knochenmarkstammzellen

Das Knochenmark ist eine autologe Quelle für zwei Subpopulationen adulter Stammzellen. Die in großen Mengen vorkommenden hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) werden auch Blutstammzellen genannt. Aus den HSZ entwickeln sich sämtliche myeloiden und lymphoiden Zelltypen und regenerieren somit ständig das Blut- und Lymphsystem. Die sehr gut charakterisierten und untersuchten HSZ werden in der Klinik zum Beispiel zur Behandlung von Leukämie eingesetzt.

In dieser Arbeit stehen jedoch die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks (MSZ) im Vordergrund. Diese nicht-hämatopoetischen Stammzellen wurden von Cohnheim schon 1867 vermutet, konnten aber erst in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts nachgewiesen werden (Cohnheim, 1867; Friedenstein et al., 1970; Friedenstein et al., 1976). Friedenstein und Kollegen kultivierten adultes Knochenmark in unbeschichteten Zellkulturschalen. Nach wenigen Stunden wurde die Zellsuspension entfernt und nur die adhärennten Zellen weiterkultiviert. Diese Fibroblasten-ähnlichen Zellen proliferierten in typischen Kolonien, besser bekannt als *colony-forming units-fibroblasts*, CFU-F. Daran anschließende Arbeiten konnten zeigen, dass die Zellen in Zelltypen des Mesoderms differenzieren konnten: Adipozyten, Chondrozyten, Myoblasten und Osteoblasten (Caplan, 1991; Owen und Friedenstein, 1988; Pereira et al., 1995; Pittenger et al., 1999; Reyes et al., 2001). Diese Entdeckung brachte den Zellen die Bezeichnung mesenchymale Stammzellen ein.

Bis heute ist es noch nicht gelungen, Oberflächenmarker zu identifizieren, mit denen nur MSZ erfasst werden können. Somit sind die Adhärenz an Plastikoberflächen und die Differenzierung in mesodermales Gewebe die einzigen Eigenschaften, anhand derer MSZ nachgewiesen werden können.

1.3 Plastizität

Die Plastizität beschreibt die Fähigkeit einer Zelle, über Keimblattgrenzen hinweg zu differenzieren. Dadurch nimmt die Zelle das Expressionsprofil und auch den funktionellen Phänotyp eines Zelltyps eines anderen Keimblattes an. So spricht man beispielsweise von neuronaler Plastizität, wenn sich in Abhängigkeit ihrer Verwendung die Eigenschaften von Synapsen, Nervenzellen oder sogar ganzen Hirnarealen verändern. In einer Vielzahl von Arbeiten wurde das Phänomen der Plastizität auch für Knochenmarkstammzellen beschrieben. Man fand heraus, dass MSZ unter anderem Eigenschaften von Skelett- und

Herzmuskelzellen (Ferrari et al., 1998; Orlic et al., 2001), Leberzellen (Petersen et al., 1999) und Epithelzellen (Krause et al., 2001) annehmen können.

Kopen und Mitarbeiter konnten sogar eine neuroektodermale Differenzierung von MSZ nachweisen. Sie injizierten MSZ in die lateralen Ventrikel neonataler Mäuse. Die Zellen wanderten durch Vorderhirn und Zerebellum, ohne die Hirnstruktur zu zerstören. Die MSZ wurden in verschiedenen Hirnarealen wiedergefunden und exprimierten GFAP (Markerprotein für reife Astrozyten) oder neuronale Markerproteine (NF) (Kopen et al., 1999).

Als Erklärung für das Phänomen der Stammzellplastizität stehen mehrere Konzepte zur Verfügung: Transdifferenzierung, De-Differenzierung, Existenz multipler Stammzellen bzw. einer pluripotenten Stammzelle oder Zellfusion (Wagers und Weissman, 2004). Unter Transdifferenzierung versteht man die direkte Umwandlung einer determinierten Zelle in eine andere determinierte Zelle. Ein Beispiel hierfür ist die Differenzierung von neuronalen Stammzellen in Blutzellen (Bjornson et al., 1999). Bei der De-Differenzierung geht eine determinierte Zelle in eine primitivere multipotente Zelle über. Diese höherpotente Zelle kann nun in einen anderen als den ursprünglichen Zelltyp differenzieren. Während der De-Differenzierung können sowohl Entwicklungslinien als auch die Zugehörigkeit zu Keimblättern geändert werden. Die Schwanzlurche sind die bekanntesten Organismen, die durch De-Differenzierung die Fähigkeit zur Regeneration amputierter Gliedmaßen besitzen. Eine dritte Möglichkeit für Plastizität ist das Vorhandensein anderer Stammzellpopulationen innerhalb der untersuchten Gewebe. Somit könnte die Verunreinigung der untersuchten Zellpopulation mit Stammzellen anderer Keimblätter oder Entwicklungslinien und deren Differenzierung irrtümlich als Transdifferenzierung gedeutet werden. Auch die Existenz von pluripotenten Stammzellen, die neben den MSZ und HSZ im Knochenmark vorkommen, kann eine Erklärung für Plastizität sein. Eine der ersten Subpopulationen der Knochenmarkstammzellen waren die MAPC (*multipotent adult progenitor cell*) (Jiang et al., 2002). Werden die MAPC in eine Blastozyste injiziert, so können sie in fast alle somatischen Zelltypen differenzieren. Die Gruppe um D'Ippolito isolierte aus humanem Knochenmark eine Zellpopulation nicht-hämatopoetischen Ursprungs (MIAMI-Zellen, *marrow-isolated adult multilineage inducible cells*), welche in Zelltypen des Meso-, Ekto- und Endoderms differenzieren können (D'Ippolito et al., 2004). Ebenfalls von großer Bedeutung sind die VSEL-Zellen (*very small embryonic like stem cells*). Hierbei handelt es sich um eine homogene Population von sehr kleinen, den embryonalen Stammzellen ähnlichen Zellen, die typische Marker für pluripotente Stammzellen exprimieren (Oct-4, Nanog, Rex-1) (Kucia et

al., 2006). Auch diese Subpopulation ließ sich in Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren.

Der letzte mögliche Mechanismus ist die Zellfusion. Es entsteht zunächst eine binukleäre Zelle, die über das Genexpressionsprofil der Ausgangszellen verfügt. Im weiteren Verlauf kann es zur Verschmelzung der beiden Zellkerne kommen, sodass eine mononukleäre, polyploide Zelle entsteht. In diversen *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass murine Knochenmarkstammzellen (Terada et al., 2002) bzw. aus dem Maushirn entnommene Zellen (Ying et al., 2002) mit ES-Zellen fusionieren und einige phänotypische Eigenschaften der ES-Zellen annehmen.

1.4 Induzierte pluripotente Stammzellen

Bei induzierten pluripotenten Stammzellen, abgekürzt iPS Zellen, handelt es sich um pluripotente Zellen, die durch sogenannte Rückprogrammierung aus somatischen nicht pluripotenten Zellen erzeugt werden. Zum ersten Mal wurden iPS Zellen im Jahr 2006 von Takahashi und Yamanaka beschrieben. Es gelang ihnen, aus murinen embryonalen und adulten Fibroblasten, also differenzierten Zellen, pluripotente und somit undifferenzierte Zellen zu generieren. Mittels retroviraler Transduktion mit vier Transkriptionsfaktoren (Oct3/4, SOX2, c-Myc und Klf4) konnten die somatischen differenzierten Fibroblasten in undifferenzierte Stammzellen reprogrammiert werden. Die so erzeugten iPS Zellen wiesen eine ähnliche Morphologie und auch ähnliche Wachstumseigenschaften wie ES-Zellen auf. Außerdem exprimierten sie ES-Zell-Markergene. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach subkutaner Transplantation der iPS Zellen in Nacktmäuse Tumore entstanden, die Gewebe aller drei Keimblätter enthielten (Takahashi und Yamanaka, 2006).

Nur ein Jahr später wurde unabhängig voneinander durch Takahashi und Yu der Nachweis erbracht, dass auch aus humanen Fibroblasten induzierte pluripotente Stammzellen generiert werden können (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Erstere verwendeten adulte dermale Fibroblasten, die sie durch Transduktion mit den vier bereits bekannten Transkriptionsfaktoren Oct3/4, SOX2, c-Myc und Klf4 in einen ES-Zellen ähnlichen Zustand brachten. Diese humanen iPS Zellen ähnelten in Morphologie, Proliferation und Genexpression den humanen ES-Zellen und konnten in Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren (Takahashi et al., 2007).

Die Gruppe um Yu entwickelte iPS Zellen aus juvenilen humanen dermalen Fibroblasten ebenfalls unter Verwendung von vier Transkriptionsfaktoren. Allerdings ersetzten sie die Transkriptionsfaktoren c-Myc und Klf4 durch Lin28 und Nanog. Auch diese iPS Zellen

exprimierten Gene und Oberflächenproteine, die charakteristisch für ES-Zellen sind und bildeten Tumore, die Zellen der drei embryonalen Keimblätter aufwiesen (Yu et al., 2007).

1.5 Experimenteller Einsatz von Stammzellen

In den therapeutischen Einsatz von Stammzellen, sowohl embryonalen als auch adulten Ursprungs, werden große Hoffnungen gesetzt. Dies ist vor allen Dingen auf das Differenzierungspotenzial der Stammzellen zurückzuführen. Da die Verwendung von ES-Zellen jedoch ethisch höchst umstritten ist, rücken die adulten Stammzellen immer mehr in den Fokus der regenerativen Medizin. Vom Einsatz exogener adulter Stammzellen im Menschen ist man jedoch in vielen Bereichen noch weit entfernt. Eine seit mehr als 40 Jahren erfolgreiche Anwendung ist die Therapie von Leukämien mit blutbildenden Stammzellen (HSZ) aus dem Knochenmark.

Im Folgenden sollen einige Beispiele einen kurzen Einblick in den experimentellen Einsatz von Stammzellen geben.

1.5.1 Tissue Engineering

Unter Gewebekonstruktion bzw. Gewebezüchtung (engl. *tissue engineering*) versteht man die künstliche Herstellung von biologischem Gewebe durch gerichtete Zellkultivierung. Ziel ist es, mit dem so generierten Gewebe das kranke Gewebe eines Patienten zu ersetzen oder zu regenerieren. Für die erfolgreiche Konstruktion von Gewebe benötigt man geeignete Stammzellen, ein strukturelles Gerüst, ein adäquates Kulturmedium und das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren.

Sharma et al. fanden heraus, dass MSZ phänotypische und physiologische Ähnlichkeiten zu den glatten Muskelzellen der Blase aufweisen. Das legt die Vermutung nahe, dass MSZ als alternative Zellquelle für defekte Muskelzellen der Blase dienen können. Sie verwendeten Pavianblasen, die einer Zystektomie unterzogen wurden, in Verbindung mit MSZ, um eine partielle Blasenregeneration zu erzielen. Die MSZ füllten den chirurgisch transplantierten Bereich auf und blieben auch noch 10 Wochen nach der Operation aktiv. Außerdem exprimierten die transplantierten MSZ Schlüsselmarker der glatten Muskelzellen (Sharma et al., 2011).

Auch für die Regeneration peripherer Nerven können MSZ verwendet werden. Keilhoff et al. generierten aus kultivierten MSZ der Ratte durch Transdifferenzierung Zellen (tMSZ), welche typischen spindel-förmigen Schwann Zellen ähnelten. Diese tMSZ waren zur

Myelinisierung von Axonen fähig, der Hauptfunktion von Schwann Zellen im peripheren Nervensystem (Keilhoff et al., 2006).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MSZ in Gefäß-ähnliche Zellen differenzieren können, was diese Zellen zu erfolgversprechenden Kandidaten zur Herstellung von Gefäßtransplantaten macht. Oswald et al. generierten MSZ mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation aus mononukleären Knochenmarkzellen. Durch die Zugabe von FKS (fötales Kälberserum) und VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) differenzierten die MSZ in Endothel-ähnliche Zellen, welche phänotypische und funktionelle Merkmale der Endothelzellen aufwiesen (Oswald et al., 2004).

1.5.2 Neurodegenerative Erkrankungen

Bei neurodegenerativen Erkrankungen handelt es sich um Krankheiten, die in der Regel langsam fortschreiten, vererbt werden oder sporadisch auftreten. Eines haben sie jedoch gemein: Das Absterben von Nervenzellen, was zu verschiedensten neurologischen Symptomen führt.

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung des ZNS, die durch chronische Entzündung, Entmarkung der Nervenzellfortsätze und neuronale Schäden charakterisiert ist. Momentan gibt es noch keine Möglichkeit diese Krankheit zu heilen. Mit der Hilfe von Tiermodellen versuchen Forscher der MS-Pathologie auf die Spur zu kommen. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine der MS ähnliche Erkrankung von Labortieren. Den Tieren, hauptsächlich Mäusen, werden Myelin-immunogene Peptide (z. B. Myelin-basisches Protein, Proteolipid-Protein oder Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein) injiziert, wodurch es zu einem Autoimmunprozess kommt. Das führt zu den bereits erwähnten Symptomen: Entzündungsreaktionen, Demyelination und Verlust von Nervenzellen und Nervenfasern. Zappia und Kollegen konnten zeigen, dass eine intraventrikuläre Infusion von MSZ, verbunden mit der Herunterregulierung von aktiven T-Zellen, die Krankheitslast signifikant reduziert. Das lässt vermuten, dass die MSZ hier immunsuppressiv, also entzündungshemmend, wirken (Zappia et al., 2005).

Der positive Effekt der MSZ scheint sich aber nicht nur auf die Modulation der Immunantwort zu beschränken, sondern führt auch zu einer direkten Beeinflussung der Neurogenese. Histologische Untersuchungen an EAE-Tieren, die mit MSZ behandelt wurden, belegen eine Zunahme der Oligodendrozytenanzahl, eine gesteigerte Remyelination und verbesserte axonale Integrität in den Läsionsarealen, die MSZ enthalten (Bai et al., 2009).

Der Schlaganfall, auch als apoplektischer Insult bezeichnet, zählt ebenfalls zu den neurodegenerativen Erkrankungen. Es handelt sich um eine plötzlich auftretende Erkrankung, bei der es zum Absterben komplexer Hirnareale kommt. Das betrifft sämtliche dort ansässige Zellen (Astrozyten, Neurone, Oligodendrozyten, Endothelzellen). Als Ursache ist eine Mangelversorgung des Gehirns bzw. der entsprechenden Hirnareale mit Sauerstoff und Glukose zu nennen. Dieser liegt eine Reduktion des Blutflusses, bedingt durch einen Gefäßverschluss oder durch eine spontane Blutung, zu Grunde. Die Symptome eines Schlaganfalles sind vielfältig. Dazu zählen: Sehstörungen, Gesichtsfeldausfälle, Doppelbilder, Lähmungen, Schwindel, Sprachstörungen, äußerst starke Kopfschmerzen.

Bislang ist es nur möglich den sogenannten thrombotischen Schlaganfall zu behandeln. Das Mittel der Wahl ist der Plasminogenaktivator t-PA (*tissue plasminogen activator*), der als Thrombolytikum den Thrombus auflösen soll und so die Blutversorgung des Gehirns wiederherstellt. Für diese Behandlungsform kommen jedoch nur wenige Patienten innerhalb eines engen Zeitfensters in Frage. Die Therapie mit t-PA beinhaltet allerdings keine Neuroprotektion. Das stellt wiederum den Angriffspunkt für den Einsatz von Stammzellen dar. Anders als beim *tissue engineering*, was der Rekonstruktion einer verhältnismäßig homogenen Zellpopulation bedarf, muss nach einem Schlaganfall ein mannigfaltiges Netzwerk aus Astrozyten, Neuronen, Oligodendrozyten und Endothelzellen rekonstruiert werden. In diversen tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Injektion von MSZ das Infarktvolumen signifikant verringern kann. Eine einmalige intravenöse Gabe von 3×10^6 MSZ 6 h nach dem Schlaganfall resultierte in einer Verringerung des Läsionsgebietes und einer Verbesserung der funktionellen Erholung der neurologischen Defizite (Omori et al., 2008). Außerdem gibt es Beweise dafür, dass injizierte MSZ diverse neurotrophe Faktoren (HGF, VEGF, BDNF, bFGF, FGF-2) sezernieren, die eine wichtige Rolle in der Neurogenese und Angiogenese spielen (Chen et al., 2002; Chen et al., 2003; Mahmood et al., 2004; Qu et al., 2007).

1.6 Gegenstand der vorliegenden Arbeit

Nach wie vor spielt die Erforschung des Differenzierungsverhaltens von mesenchymalen Knochenmarkstammzellen eine große Rolle in der gegenwärtigen Forschung. Dass diese Zellen in Zelltypen des Mesoderms differenzieren, ist hinreichend bekannt. Immer noch ungelöst ist die Fragestellung, ob MSZ auch die Fähigkeit besitzen in neuroektodermale Zelltypen zu differenzieren. Durch die bereits gewonnenen Erkenntnisse sind die Erwartungen an einen potentiellen Einsatz dieser Stammzellen in zellbasierten Therapieansätzen enorm gestiegen. Ein großer Vorteil der MSZ ist deren relativ unkomplizierte Gewinnung aus dem Knochenmark des Patienten, was wiederum eine autologe Transplantation ermöglicht und somit keine Transplantatabstoßung verursacht.

Arbeiten verschiedener Forschungsgruppen konnten zeigen, dass MSZ eine heterogene Population bilden. Sauerzweig et al. fanden heraus, dass neben den Fibroblasten-ähnlichen Zelltypen Subpopulationen von kleinen, meist abgerundeten Zellen innerhalb der MSZ existieren. Diese sogenannten SD-KMSZ (Serumdeprivations-induzierte Knochenmarkstammzellen) wurden durch einen Serumentzug selektiv zur Proliferation angeregt und weisen eine erhöhte Expression von Markerproteinen auf, die typisch für neurale und embryonale Stammzellen sind (Sauerzweig et al., 2009a).

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin herauszufinden, unter welchen *in vitro* Wachstumsbedingungen solche Subpopulationen selektiv angereichert werden können. Dafür sollten verschiedene Möglichkeiten untersucht werden: (1) Einsatz von speziellen Medien, (2) Induktion von Sphärulen und (3) Ko-Kultivierung mit kortikaler Primärkultur. Die dadurch erzeugten Zellpopulationen sollten mittels Phasenkontrastmikroskopie, Videomikroskopie, immunzytochemischen Färbungen, konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und quantitativer Real-Time PCR genauer charakterisiert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
12-Loch-Kulturplatten	TPP, Trasadingen, CH
12-Loch-Kulturplatten für <i>Time-Lapse</i>	Corning, Wiesbaden, D
Analysenwaage BP 211 D	Sartorius, Göttingen, D
Analysenwaage PT310	Sartorius, Göttingen, D
Bioreaktorröhrchen, 50 ml	TPP, Trasadingen, CH
CCD-Kamera Axioacam MRm	Carl Zeiss, Jena, D
CO ₂ -Inkubator C200	Labotect, Göttingen, D
CTI-Controller 3700 digital	PeCon, Erbach, D
Deckgläschen	Karl Hecht „Assistent“, Sondheim, D
Einfriercontainer Mr. Frosty	Nunc, Wiesbaden, D
Einmal-Zählkammer C-Chip DHC-N01	Biochrom, Berlin, D
Einwegspritzen	B. Braun, Melsungen, D
Heißluftsterilisator UT6	Heraeus, Hanau, D
Inkubationskammer Inkubator S-M	PeCon, Erbach, D
Inversmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena, D
Kanülen (23 G)	B.Braun, Melsungen, D
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, D
Labor-pH-Meter-766	Knick, Berlin, D
Laborautoklav 2540 EL	VWR, Wien, A
Laborschüttler Thermoshake	C. Gerhardt, Königswinter, D
Laminarbox	Heraeus, Hanau, D
Laserscanmikroskop LSM 5 Pascal Exciter	Carl Zeiss, Jena, D

Lightcycler 1.5	Roche, Mannheim, D
Objektiv 5× A-Plan (NA 0,12, Ph0)	Carl Zeiss, Jena, D
Objektiv 10× A-Plan (NA 0,3, Ph1)	Carl Zeiss, Jena, D
Objektiv 32× LD-A-Plan (NA 0,40, Ph1)	Carl Zeiss, Jena, D
Objektiv 10× EC Plan-Neofluar (NA 0,3)	Carl Zeiss, Jena, D
Objektiv 20× Plan-Apochromat (NA 0,8)	Carl Zeiss, Jena, D
Objektiv 40× EC Plan-Neofluar (NA 1,3, Öl)	Carl Zeiss, Jena, D
Objektiv 63× Plan-Apochromat (NA 1,4, Öl)	Carl Zeiss, Jena, D
Objektiv 10× Plan-Neofluar (NA 0,3, Ph1)	Carl Zeiss, Jena, D
Objektträger Super-Frost Plus	Menzel, Braunschweig, D
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Reinstwasseranlage arium 611 VF	Sartorius, Göttingen, D
Sicherheitswerkbank Herasafe HS12	Heraeus, Hanau, D
Spektrophotometer Ultraspec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Tempcontrol 37-2 digital	PeCon, Erbach, D
Thermomagnetrührer MR3000	Heidolph, Schwabach, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex MS3 basic	Ika, Staufen, D
Wasserbad Julabo 19	Julabo, Seelbach, D
Zeiss-Software AxioVs40 v4.5	Carl Zeiss, Jena, D
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	TPP, Trasadingen, CH
Zellsieb 40 µm	BD, Heidelberg, D
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5702 RH	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	TPP, Trasadingen, CH

2.1.2 Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Chloroform (CHCl_3)	Roth, Karlsruhe, D
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	MoBiTec, Göttingen, D
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe, D
DPX	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Eserserum	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Roth, Karlsruhe, D
Hydrochlorid (HCl)	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OH}$)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, D
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, D
Xylol	Merck, Darmstadt, D

2.1.3 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Bezeichnung	Bezugsquelle
Accutase	PAA, Pasching, A
Alpha-Medium (2,0 g/l NaHCO_3)	Biochrom, Berlin, D
B27 Supplement	Invitrogen, Darmstadt, D
bFGF (basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor)	Chemicon, Temecula, USA
biofreeze Einfriermedium	Biochrom, Berlin, D

DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium)	Biochrom, Berlin, D
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Biochrom, Berlin, D
EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)	Roche, Mannheim, D
FKS superior (fötales Kälberserum)	Biochrom, Berlin, D
Hank's BSS (Hank's gepufferte Salzlösung)	PAA, Pasching, A
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-ethansulfonsäure)	Biochrom, Berlin, D
mesenchymales Stammzell Kulturmedium	Millipore, Schwalbach, D
Matrigel	BD, Heidelberg, D
Mesenchymal Stem Cell Neurogenic Differentiation Medium (ready-to-use)	Promocell, Heidelberg, D
Neurobasal A Medium	Invitrogen, Darmstadt, D
Neural Differentiation Medium	Cellular Engineering Technologies (CET), Coralville, Iowa, USA
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10.000 µg/ml)	Biochrom, Berlin, D
Trypsin/EDTA 0.25% (v/v)/0.02% (v/v)	Biochrom, Berlin, D

hMSZ-Medium

Mesenchymales Stammzell Kulturmedium

FKS superior	10 % (v/v)
bFGF (immer frisch dazugeben)	8 ng/ml

Neurobasal A Medium für Primärkulturzellen (NB PKZ)

Neurobasal A Medium

L-Glutamin	0,5 % (v/v)
B27	0,5 % (v/v)

neurogenes Differenzierungsmedium (NDM CET)

NDM CET

FKS superior	10 % (v/v)
--------------	------------

neurogenes Differenzierungsmedium (NDM PC)

NDM PC

Primärkultur-Standardmedium

DMEM

FKS superior	10 % (v/v)
--------------	------------

Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
-------------------------	-----------

rMSZ-Standardmedium

Alpha Medium

FKS superior	20 % (v/v)
--------------	------------

Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
-------------------------	-----------

Hepes	2 mM
-------	------

serumfreies Standardmedium

Alpha Medium

Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
-------------------------	-----------

HEPES	2 mM
-------	------

Sphärulen-Standardmedium für rMSZ

Alpha Medium

FKS superior	20 % (v/v)
--------------	------------

Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
-------------------------	-----------

EGF	20 ng/ml
-----	----------

bFGF	20 ng/ml
------	----------

Sphärulen-Standardmedium für hMSZ

Mesenchymales Stammzell Kulturmedium

FKS superior 20 % (v/v)

EGF 20 ng/ml

bFGF 20 ng/ml

2.1.4 Puffer und Lösungen

PBS 0,1 M NaCl 137 mM

Na₂HPO₄ 8,1 mM

NaH₂PO₄ 1,4 mM

- in Aqua dest. lösen

- auf pH 7,4 einstellen

PFA 4 % (m/v) Paraformaldehyd 4 g

PBS 100 ml

- unter Rühren auf 65 °C erwärmen, bis Lösung klar ist

- dann durch einen Faltenfilter filtrieren

Matrigel-Lösung Matrigel 100 µl

Standardmedium 3 ml

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen anti β III Tubulin	1:500	Hiss Diagnostics, Freiburg, D
Maus anti β III Tubulin	1:500	Promega, Mannheim, D
Ratte anti BrdU	1:100	Serotec, Düsseldorf, D
Ziege anti DCX	1:500	Santa Cruz, Heidelberg, D
Maus anti GFAP	1:500	Chemicon, Hampshire, UK
Maus anti Nestin	1:500	BD Transduction Lab., San Jose, USA
Kaninchen anti NG2	1:500	Chemicon, Hampshire, UK

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Alle für die Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Sekundärantikörper stammen aus Esel und wurden über Dianova (Hamburg, D) bezogen. Sie waren mit Cy2, Cy3 bzw. Cy5 konjugiert und wurden 1:750 verdünnt eingesetzt.

2.1.5.3 Fluorochrome der Sekundärantikörper

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Cy2 (Carbocyanin)	490 nm	508 nm (grün)
Cy3 (Indocarbocyanin)	550 nm	570 nm (rot)
Cy5 (Indodicarbocyanin)	650 nm	670 nm (violett)

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die Isolierung von Knochenmarkstammzellen wurden männliche juvenile Sprague-Dawley-Ratten (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich) mit einem Gewicht zwischen 70 und 90 g verwendet. Die neuronalen Primärkulturen wurden aus Embryonen des Embryonaltags 18 (E18) von Wistarratten (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich) gewonnen. Die Versuchstiere wurden in einem klimatisierten Tierlabor mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden und einer Raumtemperatur von 20 °C gehalten. Die relative Luftfeuchte betrug 50 % - 60 %. Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

2.2.2 Isolierung und Kultivierung der Knochenmarkstammzellen

Das Knochenmark wurde aus juvenilen männlichen Sprague-Dawley-Ratten isoliert. Hierfür wurden die Tiere (25 pro Präparation) mit Chloroform narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden sie in 70 %iges Ethanol getaucht, um die Keimzahl zu vermindern. Die Hinterläufe wurden aus den Gelenkpfannen des Beckens gelöst, wobei darauf geachtet wurde, dass die Oberschenkelknochen intakt blieben. Nach Reinigen der Hinterläufe in 70 %igem Ethanol und anschließendem Waschen in PBS wurden diese bis zum Ende der Präparation in 4 °C-kaltem Alpha-Medium zwischengelagert.

Die Oberschenkel- und Unterschenkelknochen wurden unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank der Klasse 2) sorgfältig vom umliegenden Gewebe gesäubert. Danach wurden die Enden der Knochen mit einer feinen Schere abgeschnitten. Mittels einer Spritze und aufgesetzter Kanüle (23 G) wurde das Knochenmark mit Alpha-Medium ausgespült und in sterilen Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Suspension aus gepooltem Knochenmark und Alpha-Medium wurde grob von Knochenresten gereinigt und zentrifugiert (1200 rpm, 2 min). Das Zellpellet wurde in Alpha-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert (1200 rpm, 2 min). Danach wurde das Zellpellet in 15 ml Hankspuffer und 5 ml Accutase resuspendiert. Die Zugabe der Accutase bewirkte ein Auflösen der Zell-Zell-Kontakte durch Proteinspaltung und die Chelierung von Ca^{2+} -Ionen. Diese Reaktion wurde nach 1-minütiger Inkubationszeit durch Zugabe von 10 ml Alpha-Medium gestoppt, die Zellen abzentrifugiert und in 10 ml Alpha-Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mit einer Einmal-Zählkammer wurden die Zellen mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/cm² in T75-Zellkulturflaschen mit rMSZ-Standardmedium kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 92 % relativer Luftfeuchte.

Nach drei Tagen wurden die nicht-adhärenenten Zellen zusammen mit dem Medium abgenommen. Die adhärenent wachsenden Knochenmarkstammzellen (rMSZ) wurden in frischem rMSZ-Standardmedium weiterkultiviert, bis der Zellrasen eine 80 %ige Konfluenz erreicht hatte.

2.2.3 Kryokonservierung und Revitalisierung der Knochenmarkstammzellen

Der Zellrasen aus rMSZ wurde nach Abspülen mit HANKS/EDTA (10:1) für 1 min mit Trypsin bei 37 °C inkubiert. Ein anschließendes Abklopfen der Zellkulturflaschen bewirkte das Ablösen der rMSZ vom Untergrund. Die Zellen wurden in biofreeze Medium zu jeweils 1 ml mit 2×10^6 Zellen in Kryoröhrchen aliquotiert. In einem Einfriercontainer wurden die Zellen langsam auf -80 °C heruntergekühlt. Nach 24 h konnten die eingefrorenen Zellen in Flüssig-Stickstoff überführt werden.

Die Revitalisierung der rMSZ erfolgte durch ein zügiges Auftauen der Zellsuspension bei 37 °C und anschließendes Verdünnen auf das 10fache Volumen mit rMSZ-Standardmedium. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 2 min wurde das Zellpellet in rMSZ-Standardmedium resuspendiert und in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.4 Passagierung der Knochenmarkstammzellen

Wenn die Zellen die gewünschte Zelldichte erreicht hatten, konnten sie passagiert werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit HANKS/EDTA (10:1) gewaschen und für 1 min mit Trypsin bei 37 °C inkubiert. Durch Abklopfen der Zellkulturflasche konnten die rMSZ vom Untergrund abgelöst werden. Um die Proteasereaktion des Trypsins abzustoppen, wurde rMSZ-Standardmedium dazugegeben und die Zellkulturflasche abgespült, um sämtliche Zellen vom Untergrund abzulösen. Diese Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in rMSZ-Standardmedium resuspendiert. Nach anschließender Zellzählung wurden die Zellen in der gewünschten Zelldichte ausgesät.

2.2.5 Kultivierung und Passagierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSZ) wurden von der Firma Millipore bezogen. Die Lagerung der Zellen (1 Mio. Zellen/500 µl) erfolgte bis zur Verwendung in Flüssigstickstoff.

Durch zügiges Auftauen der Zellsuspension im Wasserbad bei 37 °C wurden die hMSZ (1 Mio. Zellen/Aliquot) revitalisiert. Die nun aufgetaute Zellsuspension wurde 1:10 mit hMSZ-Medium verdünnt und bei 1300 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml hMSZ-Medium resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche ausgesät. Die hMSZ wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 92 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen frisches hMSZ-Medium ausgetauscht.

Wenn die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht hatten, konnten sie passagiert werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit HANKS/EDTA (10:1) gewaschen und dann für 1 min mit Trypsin bei 37 °C inkubiert. Durch Abklopfen der Zellkulturflasche lösten sich die hMSZ vom Untergrund. Um die Proteasereaktion des Trypsins abzustoppen, wurden 5 ml hMSZ-Medium dazugegeben und die Zellkulturflasche abgespült, um sämtliche Zellen vom Untergrund abzulösen. Diese Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1300 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in hMSZ-Medium resuspendiert. Nach anschließender Zellzählung wurden die Zellen in der gewünschten Zelldichte ausgesät.

2.2.6 Beschichtung von Zellkulturflaschen und Deckgläschen mit Matrigel

Um ein gutes Wachstum der Zellen und eine mikroskopische Analyse immunzytochemisch angefärbter MSZ zu ermöglichen, wurden die Zellen in beschichtete Zellkulturflaschen bzw. auf beschichteten Deckgläschen kultiviert. Matrigel (MG) wurde über Nacht bei 4 °C auf Eis aufgetaut. Die Zellkulturflaschen bzw. die in 12-Loch-Kulturplatten befindlichen Deckgläschen wurden mit einer Matrigel-Lösung (1:30) beschichtet und für 30 min im CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Die Matrigel-Lösung wurde abgenommen und die Zellkulturflaschen bzw. die 12-Loch-Kulturplatten mit der entsprechenden Menge Medium befüllt.

2.2.7 BrdU-Inkorporations-Assay

Eine Möglichkeit der Zellmarkierung ist die Verwendung des Thymidin-Analogons 5-Brom-2-Desoxyuridin (BrdU). Während der S-Phase des Zellzyklus wird es an Stelle von Thymidin in den neu synthetisierten DNS-Strang eingebaut. Anschließend kann es mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Die so markierte Zelle hat einen BrdU-positiven Nukleus.

Passagierte rMSZ wurden in 12-Loch-Kulturplatten mit beschichteten Deckgläschen bzw. beschichtete T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Dem rMSZ-Standardmedium wurden 2 μ M BrdU zugegeben. Nach 48 Stunden wurde das BrdU-haltige Medium entnommen und die Zellen abtrypsiniert (siehe Kapitel 2.2.4).

2.2.8 Induktion von Neurosphärulen-ähnlichen Strukturen aus MSZ

Die Induktion von Neurosphärulen-ähnlichen Strukturen aus MSZ erfolgte über ein leicht modifiziertes Protokoll nach Sauerzweig und Kollegen (Sauerzweig et al., 2009a).

rMSZ unterschiedlicher Passagen wurden abtrypsiniert und 1 Mio. Zellen pro 15 ml Sphärulen-Standardmedium für rMSZ in Bioreaktoren ausgesät. hMSZ wurden entsprechend in Sphärulen-Standardmedium für hMSZ kultiviert. Bioreaktoren sind geeignete Zellkulturgefäße für die Induktion von Neurosphärulen-ähnlichen Strukturen. Da die Gefäßwände eine spezielle nicht-adhäsive Beschichtung aufweisen, wird ein Anwachsen der Zellen vermieden. Stattdessen bleiben die Zellen in Suspension. Die Zellsuspension wurde in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 92 % relativer Luftfeuchte kultiviert, bis sich Neurosphärulen-ähnliche Strukturen bildeten (24 – 48 h). Diese wurden abzentrifugiert und auf beschichtete Deckgläschen ausgesät. Außerdem wurde untersucht, ob andere Medien (NDM CET, NDM PC) einen Einfluss auf die Induktion Neurosphärulen-ähnlicher Strukturen hatten.

Die auf Deckgläschen ausgesäten Neurosphärulen-ähnlichen Strukturen wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten (2 – 48 h), in denen sie am Untergrund anwuchsen, mit 4 % PFA fixiert.

2.2.9 Serumdeprivation

Revitalisierte bzw. passagierte rMSZ wurden auf MG-beschichteten Deckgläschen in 12-Loch-Kulturplatten (50.000 Zellen pro well) bzw. T25-Zellkulturflaschen (500.000 Zellen pro T25) ausgesät. Nach einer Inkubation von 72 Stunden wurde das rMSZ-Standardmedium durch serumfreies Medium (Standardmedium ohne FKS) ersetzt. In diesem wurden die Zellen

für 3 Tage weiterkultiviert, bevor sie mittels qRT-PCR auf das Vorhandensein verschiedener Gene untersucht wurden.

2.2.10 Neurogene Differenzierung adhärent wachsender MSZ

Für die neurogene Differenzierung wurden zwei kommerziell erhältliche Medien verwendet: (1) neurogenes Differenzierungsmedium der Firma Promocell (NDM PC) und (2) neurogenes Differenzierungsmedium der Firma Cellular Engineering Technology (NDM CET).

MSZ wurden revitalisiert bzw. passagiert und mit einer Zelldichte von 50.000 MSZ/well in 12-Loch-Kulturplatten auf MG-beschichteten Deckgläschen bzw. in MG-beschichteten T25-Zellkulturflaschen (500.000 MSZ) mit Standardmedium ausgesät. Nachdem die Kultur eine 80 %ige Konfluenz erreicht hatte, wurde das Standardmedium gegen neurogenes Differenzierungsmedium (NDM) ausgewechselt.

MSZ der Ratte sowie humane MSZ wurden zwischen 1,5 h und 7 h mit NDM PC bzw. 24 h mit NDM CET bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen mit PFA fixiert oder mithilfe der qRT-PCR-Methode weiteruntersucht.

2.2.11 Präparation neuronaler Primärkulturzellen

Die trächtigen Wistar-Ratten wurden mit Chloroform in einem geschlossenen Glasbehälter betäubt und dekapitiert. Anschließend wurden die Embryonen (E18) sofort durch eine Hysterektomie entnommen. Die Embryonen wurden dekapitiert und ihre Schädel in gekühltes Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) gegeben. Der Schädel wurde mit einer Pinzette entlang der Sagittallinie geöffnet und das Gehirn entnommen. Die Kortizes wurden in 10 ml DMEM/10 % fötales Kälberserum (FKS) überführt und mithilfe einer Pipette homogenisiert. Das Homogenisat wurde in einem Zentrifugenröhrchen für zwei Minuten bei 1200 rpm und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 14 ml HANKS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml HANKS-Puffer und 1 ml Ethylendiamintetraacetat (EDTA) homogenisiert. Der Komplexbildner EDTA bindet die für die Zell-Zell-Kontakte notwendigen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen, was das spätere Vereinzeln der Zellen erleichtert. Nach nochmaligem Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes erfolgte das erneute Resuspendieren in 3 ml HANKS-Puffer. In Folge der Zugabe von 3 ml Accutase und 1 min Inkubation bei Raumtemperatur lösten sich durch Proteinspaltung und die Chelierung von Ca^{2+} -Ionen weitere Zell-Zell-Kontakte. Nach anschließender Zugabe von 8 ml DMEM/10 % FKS wurde die Proteaseaktivität der Accutase inhibiert. Nach nochmaliger Zentrifugation erfolgte das

Absaugen des Überstandes und die erneute Aufnahme des Zellpellets in 10 ml DMEM/10 % FKS. Durch mehrmaliges Aufziehen und Herausdrücken der Zellsuspension durch eine 5 ml Einwegspritze mit aufgesetzter Kanüle (23 G) konnten die Zellen weiter vereinzelt werden. Die homogene Zellsuspension wurde tropfenweise auf ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) gegeben und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

Mithilfe einer Einmal-Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Primärkulturzellen mit einer Dichte von 1 Mio. Zellen in 12-Loch-Kulturschalen ausgesät. Die Primärkulturzellen wurden für die ersten 24 h in Primärkultur-Standardmedium kultiviert. Danach erfolgte eine Mediumsumstellung auf Neurobasal A Medium für Primärkulturzellen.

2.2.12 Kokultivierung von Primärkulturzellen und rMSZ

Für die Kokultivierungsexperimente wurden 2 Tage alte Primärkulturen und rMSZ unterschiedlicher Passagen verwendet. Die rMSZ mussten vor dem Experiment mit BrdU markiert werden (siehe Kapitel 2.2.7), um die Zellen in der anschließenden immunzytochemischen Färbung von den Zellen der Primärkultur zu unterscheiden. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die rMSZ abtrypsiniert (siehe Kapitel 2.2.4). 3×10^5 Zellen wurden für 24 h bzw. 48 h zusammen mit der Primärkultur in Neurobasal A Medium kokultiviert. In Abbildung 2.1 ist der experimentelle Ansatz schematisch dargestellt.

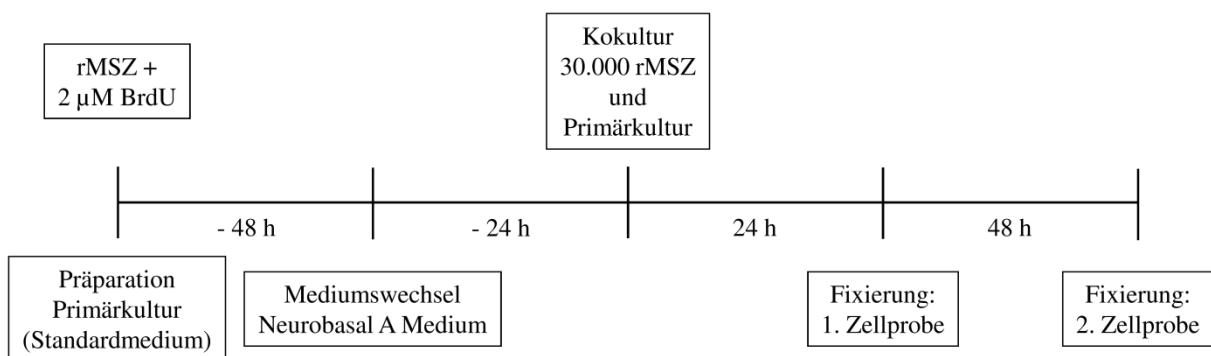


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Kokultivierungsexperimentes.

2.2.13 Immunchemische Färbungen

Mithilfe immunchemischer Färbungen ist es möglich, neben dem Nachweis einer Markerexpression auch die Zellen identifizieren zu können, welche das jeweilige Protein exprimieren. Außerdem lässt sich so auch die Morphologie der positiv gefärbten Zellen beurteilen, was bei Differenzierungsvorgängen von entscheidender Bedeutung ist.

2.2.13.1 Immunzytochemie

Zur immunzytochemischen Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurde die indirekte Methode angewandt. Die PFA-fixierten Kulturen wurden nach einem Waschschrift (3×5 min in PBS) in 10 % Eselserum in PBS/0,5 % Triton X-100 für 2 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in PBS/0,5 % Triton X-100/5 % Eselserum. Die verwendeten Primärantikörper sowie ihre Verdünnungen sind im Kapitel 2.1.5.1 aufgeführt.

Am nächsten Tag wurden die Zellen 3×5 min in PBS gewaschen. Wegen der Verwendung von lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffen wurden die darauf folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt. Die Zellen wurden mit den in PBS verdünnten Sekundärantikörpern (1:750) inkubiert (2 h, RT). Es wurden ausschließlich Cy2-, Cy3- bzw. Cy5-konjugierte Sekundärantikörper aus Esel verwendet. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen (3×5 min in PBS). Die Zellkerne wurden durch fünfzehnminütige Inkubation mit dem DNS-Marker DAPI (1:10.000 in PBS) gegengefärbt. Nach erneutem Waschen (3×5 min in PBS) wurden die Zellen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 %) entwässert und mit dem Einbettmedium DPX auf Objektträgern eingedeckelt.

Zur Kontrolle der Spezifität der Primärantikörper wurden Kulturen mitgeführt, bei denen der jeweilige Primärantikörper nicht appliziert wurde. Dies hat ein Fehlen von Bindungsstellen für den Sekundärantikörper zur Folge, wodurch es zu keiner Markierung der Zellen kam.

2.2.13.2 Anti-Bromdesoxyuridin-Färbung

Die anti-BrdU-Färbung erfolgte ebenfalls mit der indirekten Methode. Um die DNS zu denaturieren und so die Freilegung des darin eingebauten Antigens (BrdU) zu ermöglichen, ist eine Vorbehandlung nötig. Da diese Vorbehandlung den Zellkern zerstört, muss zuerst die DAPI-Färbung der rMSZ durchgeführt werden. Nach einem Waschschrift (3 x 5 min in PBS) wurden die Zellen erneut mit PFA fixiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift und eine 30-minütige Inkubation in 2 N HCl bei 37 °C. Nach einem Waschschrift (3 × 5 min in PBS) wurde wie unter 2.2.13.1 beschrieben weiter verfahren. Als Primäantikörper wurde Ratte anti-BrdU verwendet.

2.2.14 RNS Extraktion und qRT-PCR Analyse

Die RNS wurde mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche, Deutschland) aus den verschiedenen rMSZ-Proben isoliert. In Abbildung 2.2 sind die verschiedenen experimentellen Ansätze schematisch dargestellt.

Für die anschließende cDNS Synthese wurden 150 ng RNS unter Verwendung des „Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit“ (Roche) eingesetzt. Die neusynthetisierte cDNS wurde als *Template* für die quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Die qRT-PCR erfolgte mittels „Light Cycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I“ Kit (Roche) und wurde im „Light Cycler 1.5“ durchgeführt. Die dabei verwendeten Primer stammen von Qiagen und Invitrogen (Tabelle 2.1). Alle Reaktionsschritte erfolgten nach den Protokollen der entsprechenden Kits (Roche).

Für die qRT-PCR wurde folgender PCR-Mix für eine 20 µl Reaktion angesetzt:

Wasser, PCR-grade	9 µl
PCR Primer (10 x Konzentration)	2 µl
Master Mix, SYBR Green (5 x Konzentration)	4 µl
c-DNS (1:10 Verdünnung)	5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 2.1: Verwendete Primer

Primer	Hersteller
β III Tubulin	Invitrogen, Darmstadt, D
c-myc	Invitrogen, Darmstadt, D
CXCR4	Invitrogen, Darmstadt, D
G6PDH	Invitrogen, Darmstadt, D
Nestin	Qiagen, Hilden, D
NG2	Invitrogen, Darmstadt, D
Rex1	Invitrogen, Darmstadt, D
S100β	Invitrogen, Darmstadt, D
SDF1	Invitrogen, Darmstadt, D

Für die Quantifizierung der DNS-Moleküle während einer Real-time PCR spielt der Ct-Wert (Schwellenwert), eine theoretische Größe, eine wichtige Rolle. Dieser Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und sich die Kurve in der Phase des exponentiellen Wachstums befindet. Je höher die anfängliche DNS-Konzentration ist, desto eher übersteigt die Fluoreszenz den Schwellenwert und umso mehr DNS-Kopien entstehen während der PCR.

Die n-fache Expression wird mittels der Δ Ct-Methode nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{n-fache Expression (G6PDH zu Zielgen)} = 2^{(\text{Ct[G6PDH]} - \text{Ct[Zielgen]})}$$



31

2.2.15 Auswertung

2.2.15.1 Mikroskopie

Die lichtmikroskopische Analyse und Bildgebung erfolgte an einem Axiovert 200M mit einer CCD-Kamera und Zeiss-Software (AxioVs40 v4.5; Zeiss, Deutschland). Die folgenden Objektive wurden verwendet: 5× A-Plan, 10× A-Plan, 32× LD-A-Plan.

Am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopsystem (LSM 5 Pascal Exciter) mit zugehöriger Software LSM 5 Pascal v4.0 erfolgte die Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellen. Es wurden folgende Objektive verwendet: 10× EC Plan-Neofluar, 20× Plan-Apochromat, 40× EC Plan-Neofluar, 63× Plan-Apochromat. Das LSM 5 Pascal Exciter verfügte über 3 Laser (Argon $\lambda_{Em} = 450 - 530 \text{ nm}$, Helium/Neon $\lambda_{Em} = 543 \text{ nm}$, Helium/Neon $\lambda_{Em} = 633 \text{ nm}$) sowie eine Diode ($\lambda_{Em} = 405 \text{ nm}$) zur Anregung der Fluorochrome. Zur Vermeidung der Überlappung der Kanäle (engl. *crosstalk*) wurden die Präparate im Multitracking-Verfahren gescannt.

2.2.15.2 Time-Lapse-Mikroskopie

Die Analyse der neurogenen Differenzierung der rMSZ und hMSZ wurde mittels Time-Lapse-Phasenkontrastmikroskopie an einem Axiovert 200M durchgeführt. Das Mikroskop verfügte über eine CO₂- (CTI-Controller 3700 digital) und temperaturgeregelte (Tempcontrol 37-2 digital) Inkubationskammer. Die Bilder wurden unter Verwendung von Zeiss-Software (AxioVs40 v4.5) in Intervallen von 2,5 min mit einem 10× Plan-Neofluar-Objektiv und einer CCD-Kamera aufgenommen. Die MSZ wurden während der Time-Lapse-Mikroskopie in speziellen 12-Lochkulturplatten bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zu 24 Stunden kultiviert. Die relativen Zeiten sind in den Abbildungen im Format „Stunde:Minute:Sekunde“ dargestellt.

2.2.15.3 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 3. Die Überprüfung auf Signifikanz wurde mit einem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn $P < 0,05$ war.

3 ERGEBNISSE

3.1 Kultivierung von Knochenmarkstammzellen aus der Ratte

Die Gewinnung der Knochenmarkstammzellen aus der Ratte erfolgte nach einem von Sauerzweig et al. etablierten Protokoll (Sauerzweig et al., 2009a). Dazu wurde das dissoziierte Knochenmark in unbeschichtete Zellkulturflaschen ausgesät und kultiviert. Aufgrund ihrer Eigenschaft an Plastikoberflächen zu adhärieren, konnten nach drei Tagen die nicht-adhären angewachsenen Zellen durch einen Mediumswechsel von den adhären rMSZ getrennt werden.

Die rMSZ-Kulturen wiesen im Laufe der Kultivierung zwei typische Zellmorphologien auf. Zum einen konnten kleine spindelförmige Zellen und zum anderen große abgeflachte rMSZ beobachtet werden. Nach 6 Tagen in Kultur hatte sich ein konfluent Zellrasen aus rMSZ gebildet. Um sicherzustellen, dass für sämtliche Experimente dieser Arbeit genügend Zellen zur Verfügung standen, wurden die rMSZ nach Erreichen der Konfluenz abgelöst und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

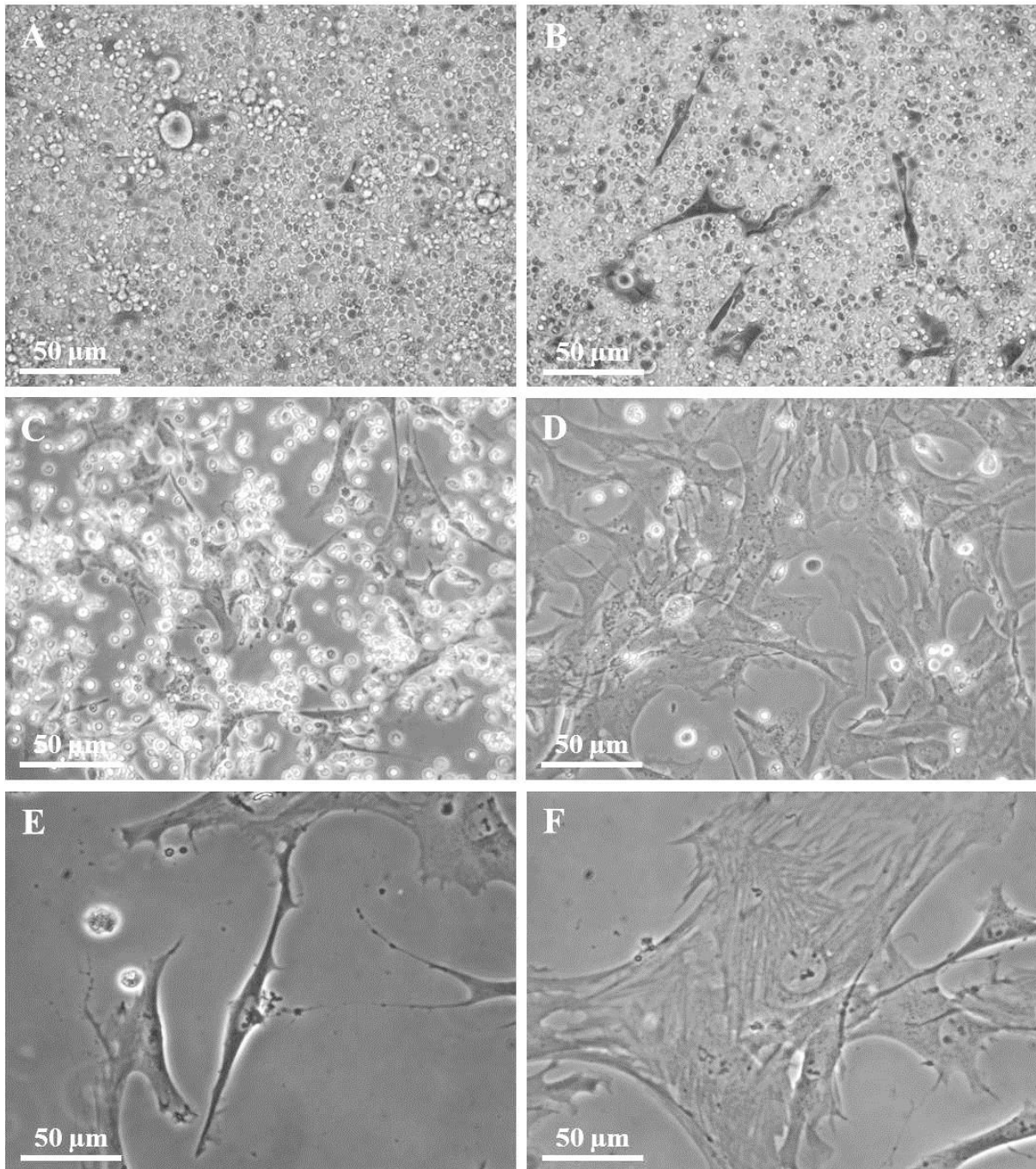


Abbildung 3.1: Isolierung und Kultivierung von mesenchymalen Knochenmarkstammzellen aus dem Knochenmark von Ratten.

(A) Dissoziiertes Knochenmark 1 Tag nach der Aussaat. (B) 2 Tage nach Aussaat sind die ersten rMSZ auf der Zellkulturoberfläche angewachsen. Am 3. Tag nach der Aussaat werden die übrigen Knochenmarkbestandteile durch Waschen entfernt. (C) Die rMSZ sind in geringer Dichte auf der Oberfläche der Zellkulturflasche angewachsen. (D) 6 Tage nach der Aussaat hat sich ein konfluenten Zellrasen entwickelt. (E) und (F) Die rMSZ können als langgestreckte Fibroblasten-ähnliche Zellen (E) oder als große abgeflachte Zellen auftreten (F). (Maßstab 50 µm)

3.2 Kultivierung von humanen mesenchymalen Knochenmarkstammzellen

Zusätzlich zu den rMSZ wurden mesenchymale Knochenmarkstammzellen humanen Ursprungs (hMSZ) verwendet. Es handelte sich dabei um tiefgefrorene Proben mit jeweils einer Million Zellen von der Firma Millipore. Somit konnten die wesentlichen Wachstumseigenschaften beider Zellpopulationen miteinander verglichen werden.

Die hMSZ wurden aufgetaut und in Zellkulturflaschen ausgesät. Schon nach wenigen Stunden begannen die ersten Zellen auf der Zellkulturoberfläche anzuwachsen. Zellen, die den Einfrier- und Auftauprozess nicht überlebten, wurden durch Mediumswechsel entfernt. Die hMSZ traten wie auch die rMSZ in zwei typischen Zellmorphologien auf: als schmale spindelförmige und als großflächige Zellen. Ein gravierender Unterschied ließ sich jedoch bei der Wachstumsgeschwindigkeit feststellen. Während die rMSZ nach 6 Tagen in Kultur eine Konfluenz von 80 – 90 % erreicht hatten, benötigten hMSZ für die gleiche Konfluenz mindestens 10 Tage.

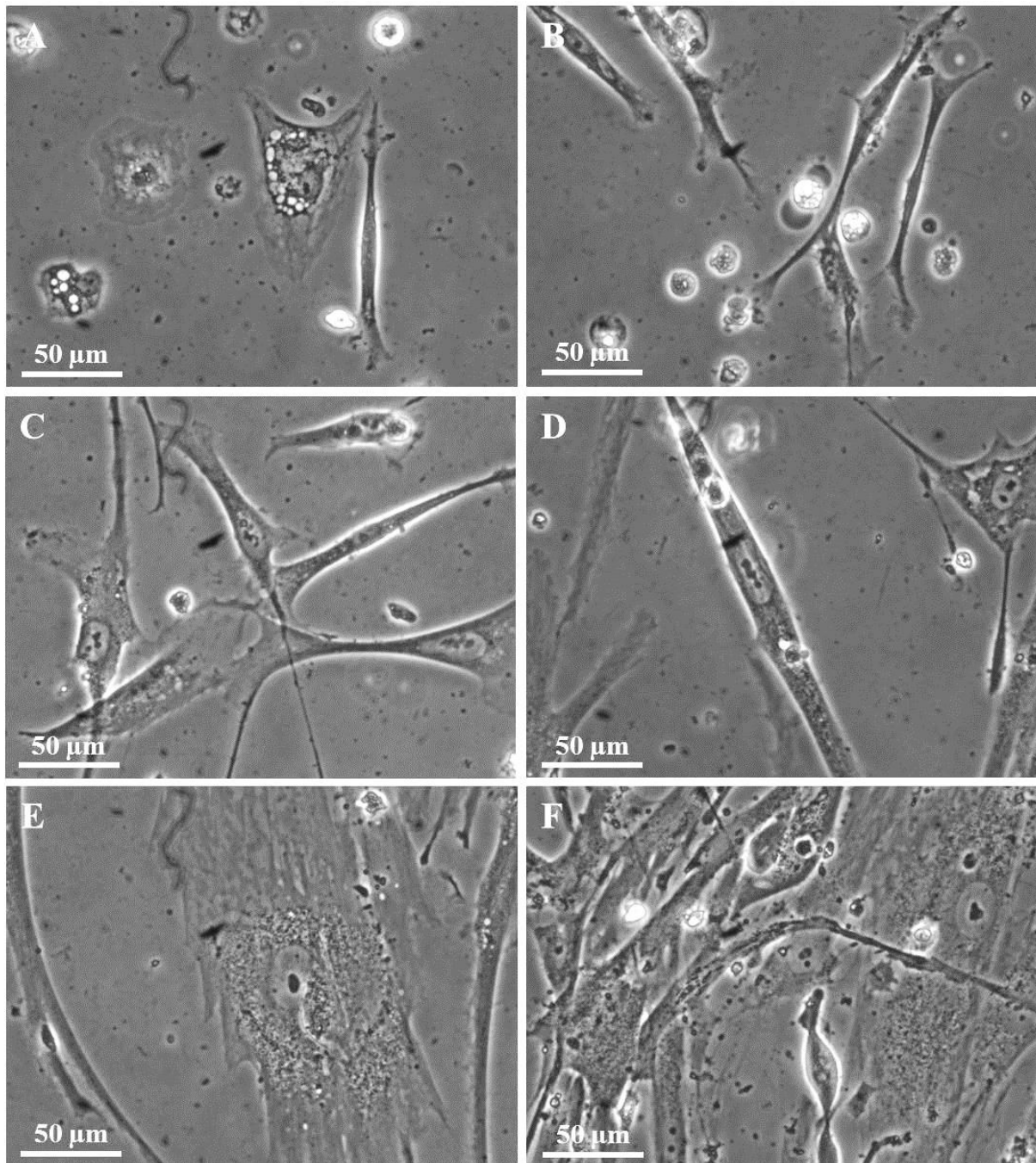


Abbildung 3.2: Kultivierung von humanen mesenchymalen Knochenmarkstammzellen.

(A) Die frisch aufgetauten hMSZ begannen 6,5 h nach der Aussaat auf der Zellkulturoberfläche anzuwachsen, viele Zellen waren stark vakuolär. (B) 1 Tag nach Aussaat waren die Vakuolen in den Zellen verschwunden. Die kleinen runden Zellen waren abgestorben und wurden mit dem Mediumswechsel entfernt. (C) Am 3. Tag nach der Aussaat waren die Zellen flächiger geworden und hatten längere Ausläufer, um auch mit weiter entfernt liegenden Zellen in Kontakt zu treten. (D) und (E) 6 Tage nach der Aussaat waren Zellen mit zwei unterschiedlichen Morphologien zu finden: schmale spindelförmige (D) und große flächige Zellen (E). (F) Nach 10 Tagen war ein konfluenten Zellrasen entstanden. (Maßstab 50 µm)

3.3 Induktion von Neurosphärulen aus rMSZ, hMSZ und embryonalen Primärkulturzellen

Die Induktion von Sphärulen ist eine anerkannte Methode, um die Existenz von neuronalen Stammzellen (NSZ) nachzuweisen. Durch Kultivierung in serumfreiem EGF- und FGF-haltigem Medium können NSZ isoliert und als frei schwimmende Zellaggregate, sogenannte Neurosphärulen, vermehrt werden (Reynolds und Weiss, 1992, Cattaneo und McKay, 1990, Vescovi et al., 1993, Storch et al., 2001).

Die Arbeiten von Sauerzweig und Kollegen zeigten jedoch, dass entgegen der etablierten Protokolle die Induktion von Neurosphärulen aus rMSZ durch Zugabe von Serum zum Medium verbessert werden konnte (Sauerzweig et al. 2009a). Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit Bioreaktoren verwendet, deren nicht-adhäsive Innenbeschichtung ein Adhären der Zellen verhinderte. Dadurch war es möglich, die rMSZ in Zellsuspension zu kultivieren. Nach nur 24-stündiger Inkubation im Bioreaktor mit rMSZ-Sphärulenmedium konnten die ersten Neurosphärulen beobachtet werden. Sie zeichneten sich durch eine Brombeer-ähnliche Struktur aus, in der bei entsprechender Vergrößerung sogar die einzelnen Zellen erkennbar waren.

Auch aus den hMSZ konnten im Bioreaktor mit hMSZ-Sphärulen-Standardmedium nach 24 Stunden Neurosphärulen induziert werden. Sie zeigten ebenfalls eine Brombeer-ähnliche Morphologie, die aber nicht so kompakt wie die der rMSZ-Sphärulen erschien.

Da Primärkulturzellen embryonaler Ratten (E18) bekanntermaßen eine Vielzahl von neuronalen Stammzellen enthalten, dienten sie als positive Referenz für die Ausbildung von Neurosphärulen. Aus E18-PKZ ließen sich genau wie aus den rMSZ und hMSZ Neurosphärulen induzieren. Allerdings wirkte die Brombeer-artige Struktur bei E18-Sphärulen am dichtesten.

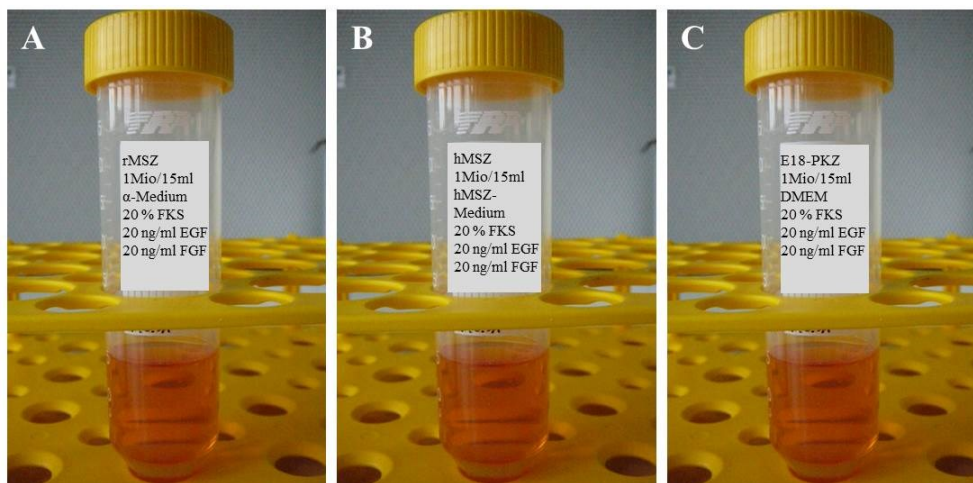


Abbildung 3.3: Bioreaktoren mit 1 Million rMSZ (A), hMSZ (B) und E18-PKZ (C).

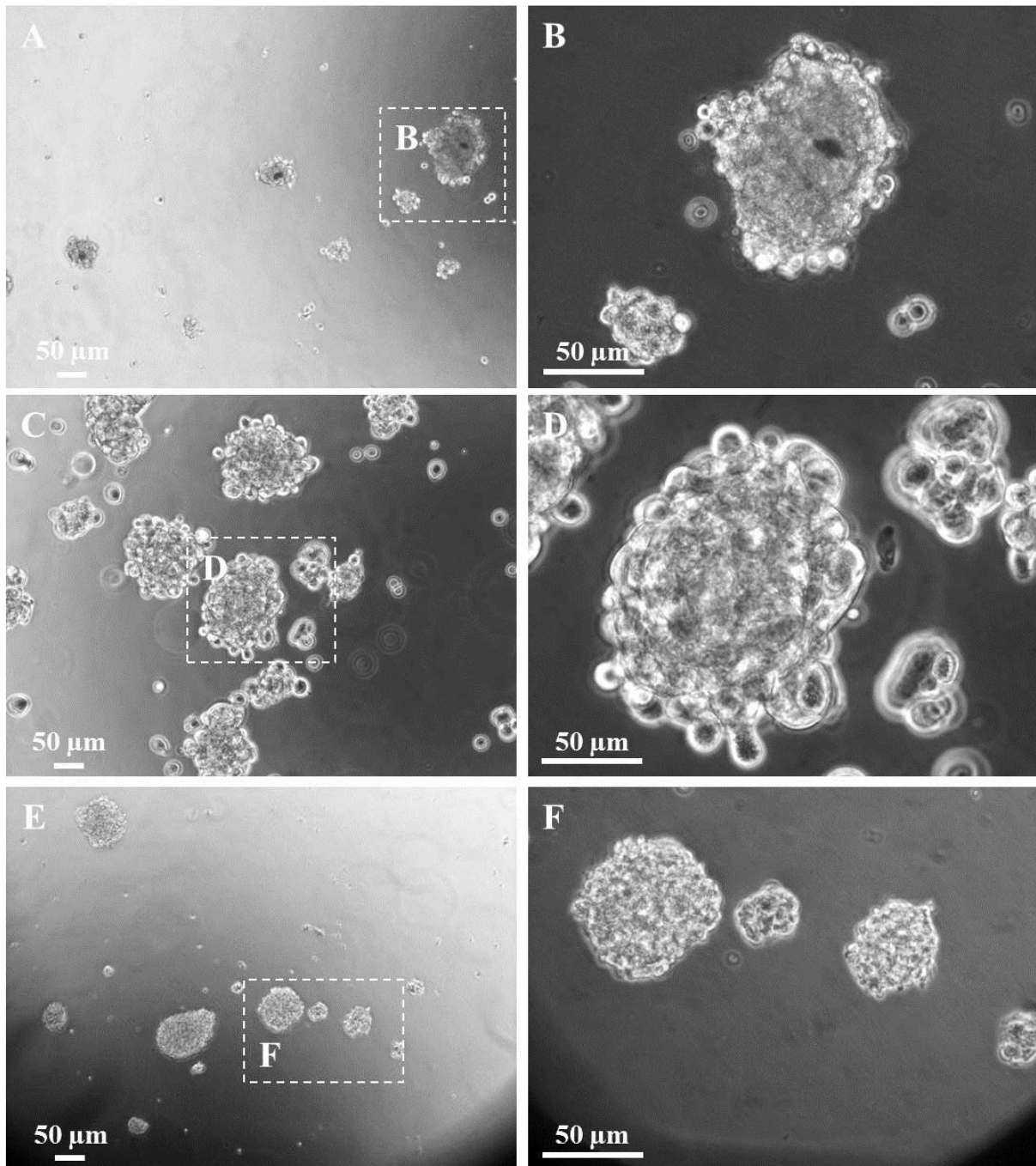


Abbildung 3.4: Induktion von Neurosphärulen.

Die Neurosphärulen (aus rMSZ, hMSZ und E18 Primärkulturzellen) wurden für 24 Stunden im Bioreaktor im jeweiligen Medium induziert.

(A) Neurosphärulen aus mesenchymalen Knochenmarkstammzellen der Ratte 1 Tag nach Induktion im Bioreaktor, (B) Vergrößerung aus (A). (C) Neurosphärulen aus humanen mesenchymalen Knochenmarkstammzellen 1 Tag nach Induktion im Bioreaktor, (D) Vergrößerung aus (C). (E) zum Vergleich Neurosphärulen aus E18 Primärkulturzellen, (F) Vergrößerung aus (E). (Maßstab 50 µm)

3.4 Expression neuroektodermaler Marker in basalen rMSZ

Die auf mit Matrigel-beschichteten Deckgläschen ausgesäten rMSZ wurden nach Erreichen der Konfluenz mit 4 % PFA fixiert und anschließend mithilfe immunzytochemischer Färbungen auf die Expression von Markerproteinen der drei neuroektodermalen Zelltypen (Astrozyten, Neurone, Oligodendrozyten) hin untersucht. Die rMSZ unter Basalbedingungen exprimierten weder astrogliale (GFAP) noch neurale (Nestin, β III Tubulin, DCX) Proteine. Es konnte nur eine schwache NG2-Färbung detektiert werden, wobei die Zellen keine für Oligodendrozyten typische Morphologie aufwiesen.

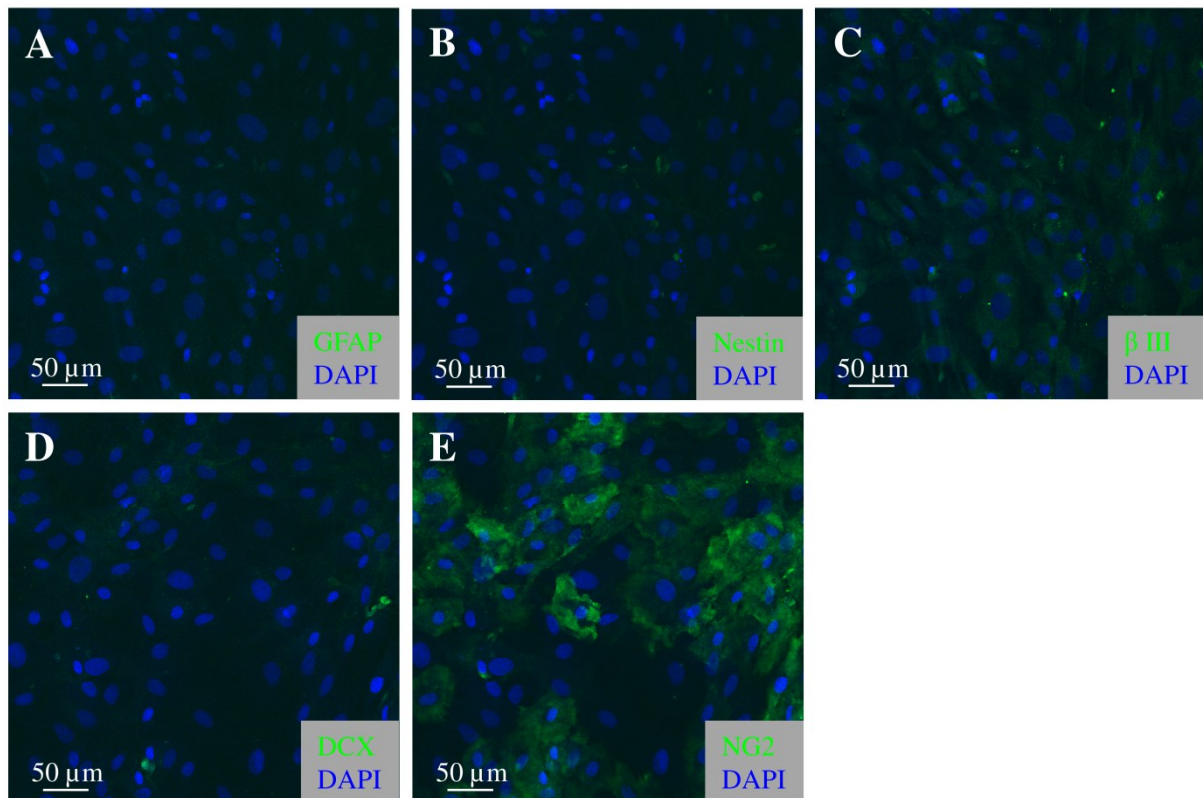


Abbildung 3.5: Expression neuroektodermaler Marker in basalen rMSZ.

Basale rMSZ waren negativ für (A) GFAP, (B) Nestin, (C) β III Tubulin und (D) DCX. (E) Eine Expression von NG2, allerdings ohne die typische Morphologie von Oligodendrozyten, konnte nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 μ m)

3.5 Expression neuroektodermaler Marker in basalen hMSZ

hMSZ wurden ebenso wie die rMSZ auf mit MG-beschichteten Deckgläschen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. In der anschließenden immunzytochemischen Färbung sollte untersucht werden, ob hMSZ unter basalen Kulturbedingungen neuroektodermale Markerproteine exprimieren. Der astrogliale Marker GFAP und der neuronale Marker DCX konnten nicht detektiert werden. Eine Expression von Nestin, einem neuroepithelialen Stammzellmarker, und β III Tubulin, einem Neuronen-spezifischen Marker ließ sich auf Proteinebene nachweisen. Die Nestin-positiven Zellen zeigten eine extrem schmale lang gestreckte Struktur, während die β III Tubulin-positiven Zellen eine großflächige Morphologie aufwiesen. Einige hMSZ exprimierten NG2, einen Marker für Oligodendrozyten, jedoch ohne das typische baumartige Erscheinungsbild.

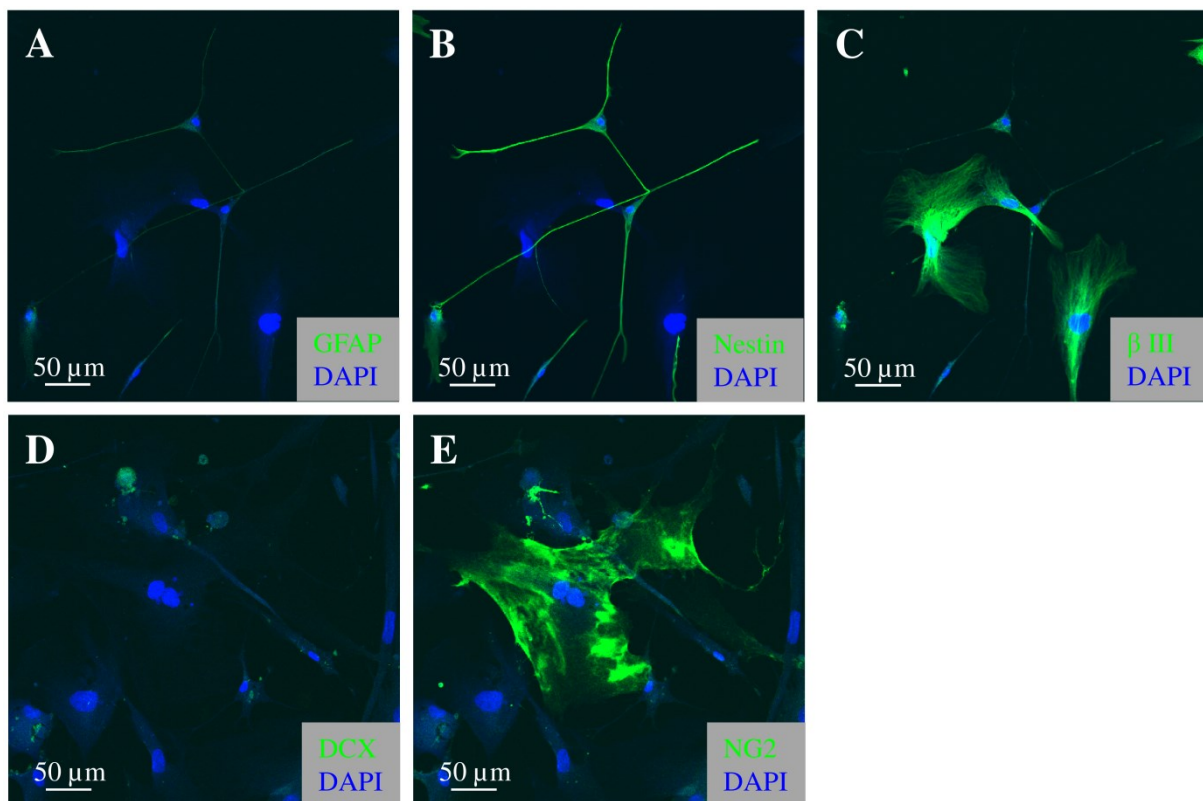


Abbildung 3.6: Expression neuroektodermaler Marker in basalen hMSZ.

hMSZ unter Basalbedingungen waren negativ für (A) GFAP und (D) DCX. Eine Expression auf Proteinebene ließ sich immunzytochemisch für (B) Nestin, (C) β III Tubulin und (E) NG2 nachweisen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 μ m)

3.6 Expression neuroektodermaler Marker in basalen embryonalen PKZ

Die embryonalen Primärkulturzellen wurden wiederum als positive Referenz verwendet. Die frisch präparierten Zellen wurden auf MG-beschichtete Deckgläschen ausgesät und 5 Tage kultiviert. Danach wurden sie für die immunzytochemischen Färbungen mit 4 % PFA fixiert. Die Expression von Markerproteinen wurde mithilfe spezifischer Antikörper untersucht. Dabei konnte eine starke Expression von Nestin in neuronalen Stammzellen und GFAP in Astrozyten gezeigt werden. Oligodendrozyten, die an ihrer baumartigen Morphologie zu erkennen waren, exprimierten das Proteoglykan NG2. Eine Kollokalisierung dieser drei Markerproteine lag nicht vor. Weiterhin konnten NeuN-positive Zellen, ein Marker für reife Neurone, detektiert werden. Auch eine Expression von DCX, einem Marker für migrierende junge Neurone, und β III Tubulin, einem Marker für junge Neurone ließ sich immunzytochemisch nachweisen. Diese beiden Marker waren zusätzlich kollokalisiert.

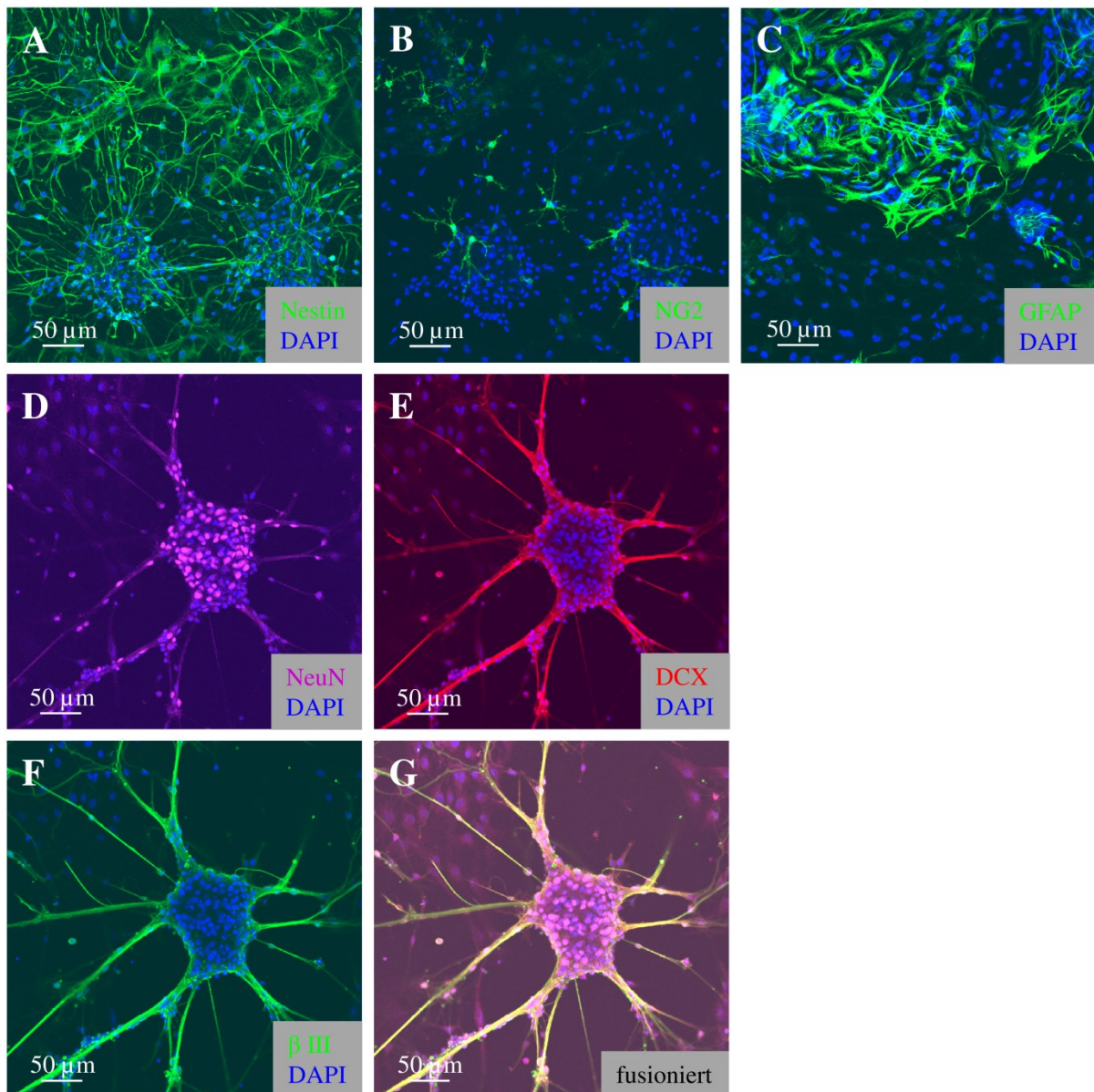


Abbildung 3.7: Expression neuroektodermaler Marker in basalen E18-PKZ.

Eine Primärkultur exprimierte unter Basalbedingungen (A) Nestin, (B) NG2, (C) GFAP, (D) NeuN, (E) DCX und (F) β III Tubulin. (G) zeigt eine fusionierte Abbildung von (D), (E) und (F). Die Kolokalisation von DCX und β III Tubulin wird durch die gelbe Färbung angezeigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 μ m)

3.7 Expression neuroektodermaler Marker in basalen rMSZ-Neurosphärulen

Die unter basalen Kulturbedingungen im Bioreaktor induzierten Neurosphärulen aus rMSZ wurden nach 24 Stunden auf mit MG-beschichteten Deckgläschen ausgesät und für 2 Stunden inkubiert. Diese Zeit reichte aus, um die Sphärulen anwachsen zu lassen. Nach anschließender Fixierung mit PFA konnten die Sphärulen immunzytochemisch auf ihr Markerprofil untersucht werden. Die Neurosphärulen wiesen immunreaktive Zellen der drei neuroektodermalen Hauptzelltypen auf. Sie exprimierten den neuroepithelialen Stammzellmarker Nestin, den Neuronenmarker β III Tubulin und den Oligodendrogliamarker NG2. GFAP, ein Astroglia marker wurde allerdings kaum exprimiert.

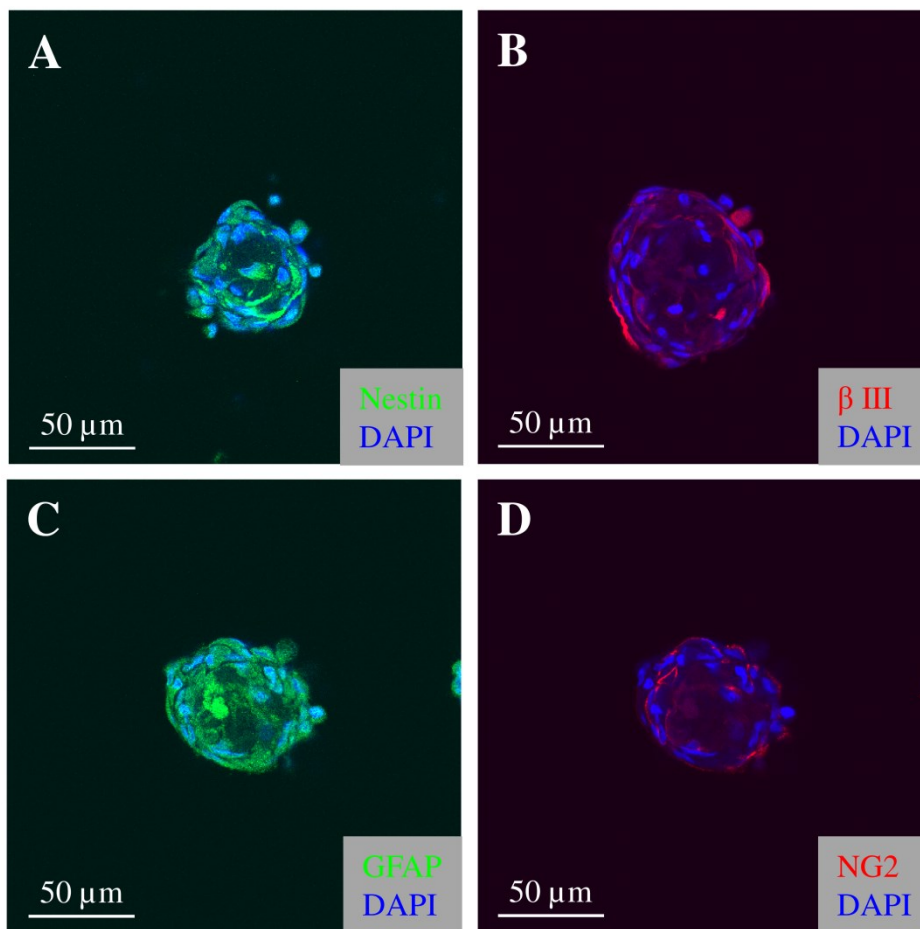


Abbildung 3.8: Expression neuroektodermaler Marker in basalen rMSZ-Neurosphärulen.

Die Sphärulen wurden für 24 h im Bioreaktor in Alpha-Medium induziert. Die Neurosphärulen der rMSZ exprimierten (A) Nestin, (B) β III Tubulin, (C) kaum GFAP und (D) NG2. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 µm)

3.8 Expression neuroektodermaler Marker in basalen hMSZ-Neurosphärulen

Die Neurosphärulen aus humanen MSZ wurden ebenfalls unter Basalbedingungen für 24 h im Bioreaktor induziert und anschließend auf MG-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Eine Inkubationszeit von 2 h genügte, damit die Neurosphärulen am Deckgläschen anwuchsen. Fixiert wurden die Sphärulen mit PFA und danach wurden sie einer immunzytochemischen Untersuchung unterzogen. Im Gegensatz zu den Neurosphärulen der rMSZ konnten weder der neuroepitheliale Stammzellmarker Nestin noch der Astrogliamarker GFAP nachgewiesen werden. Es konnte jedoch eine Expression von β III Tubulin, einem Neuronenmarker, und NG2, einem Marker für Oligodendrozyten, gezeigt werden, die hauptsächlich auf die Randzonen der Neurosphärulen beschränkt waren.

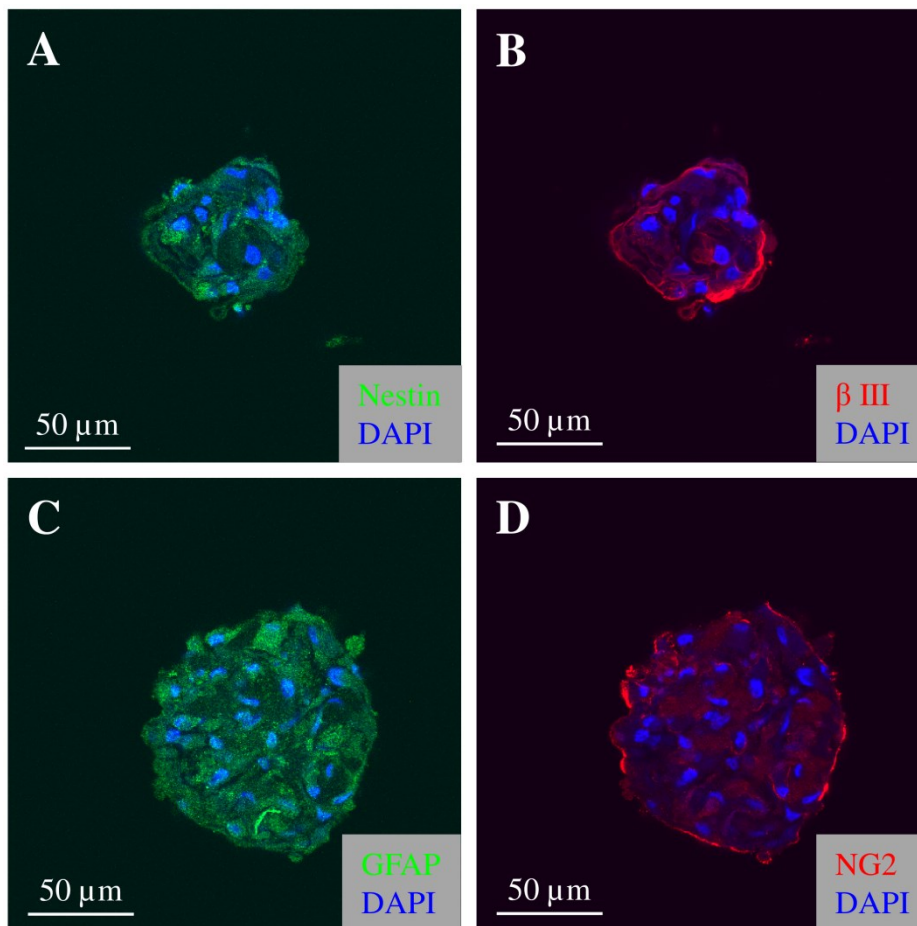


Abbildung 3.9: Expression neuroektodermaler Marker in basalen hMSZ-Neurosphärulen.

Die Sphärulen wurden für 24 h im Bioreaktor in hMSZ-Medium induziert. In den hMSZ-Neurosphärulen konnten im Vergleich zu den rMSZ-Neurosphärulen weder (A) Nestin noch (C) GFAP nachgewiesen werden. (B) β III Tubulin und (D) NG2 wurden allerdings auch von hMSZ-Sphärulen exprimiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 µm)

3.9 Expression neuroektodermaler Marker in basalen E18-Neurosphärulen

Auch im Falle der Neurosphäruleninduktion wurden die E18-Primärkulturzellen als Referenzmaterial verwendet. Genau wie die MSZ-Sphärulen aus der Ratte oder humanen Ursprungs wurden die E18-Sphärulen für 24 h im Bioreaktor unter basalen Kulturbedingungen induziert, auf Deckgläschen ausgesät und nach 2 h fixiert. Die anschließende immunzytochemische Untersuchung zeigte, dass diese Sphärulen immunreaktive Zellen für Nestin (neuroepithelialer Stammzellmarker), DCX (Marker für junge Neurone) und β III Tubulin (Neuronenmarker) aufwiesen. Dabei stellten wir eine Kolo­kalisierung von DCX und β III Tubulin fest. Eine positive Expression von GFAP (Astrogliamarker) und NG2 (Oligodendrogliamarker) konnte nicht eindeutig belegt werden.

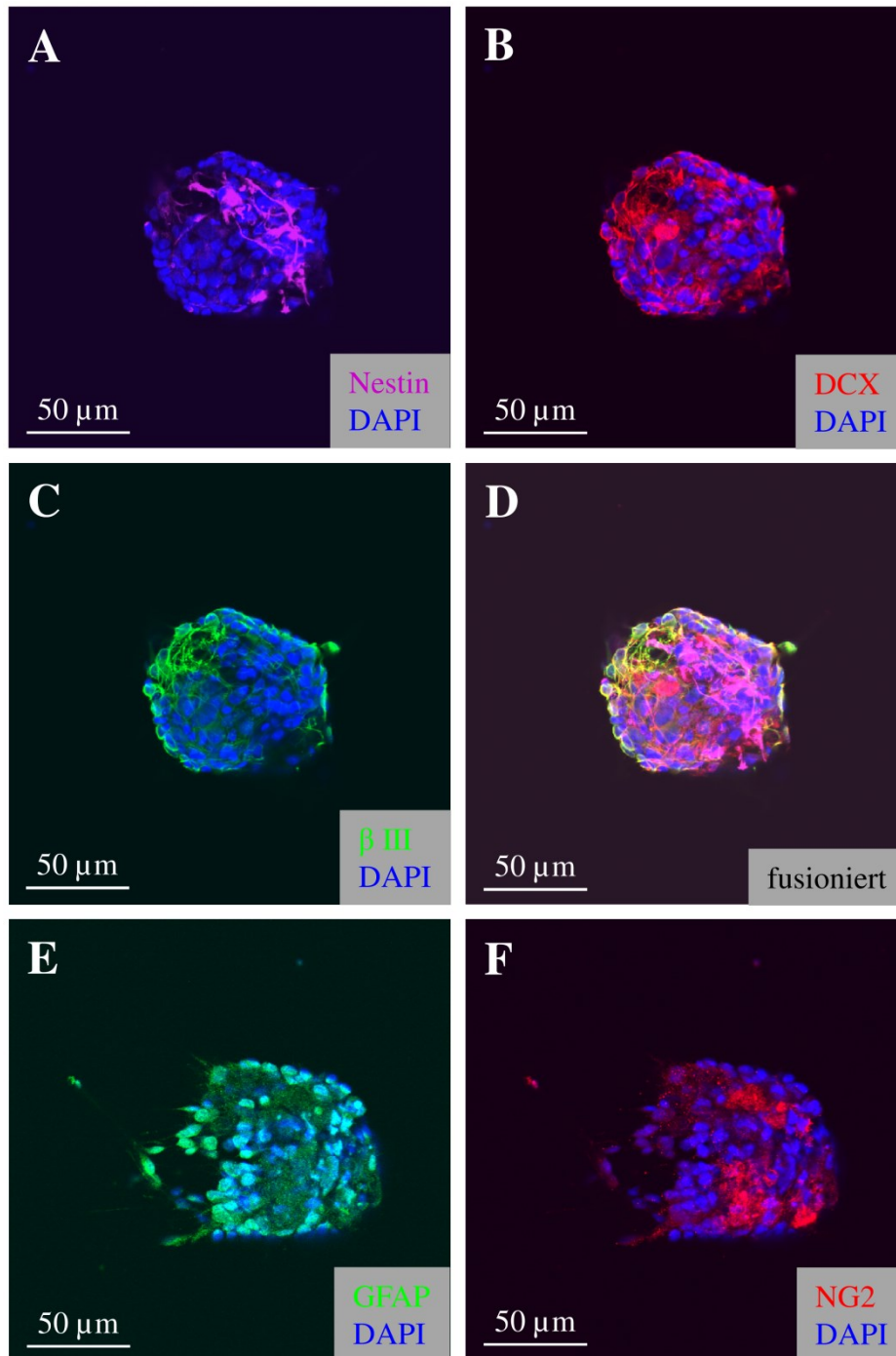


Abbildung 3.10: Expression neuroektodermaler Marker in basalen E18-Neurosphärulen.

Die Sphärulen wurden für 24 h im Bioreaktor in DMEM induziert. (A) E18-Sphärulen exprimierten Nestin. (B) Die DCX-Expression war über die gesamte Sphärule verteilt. (C) β III Tubulin konnte hauptsächlich am Rand der Sphärulen detektiert werden. (D) zeigt das fusionierte Bild aus (A) bis (C) mit der Ko-Expression von DCX und β III Tubulin in gelb. (E) GFAP und (F) NG2 konnten nicht nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 μ m)

3.10 Neuronale Differenzierung der MSZ unter adhärennten Kulturbedingungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss zweier kommerziell erhältlicher neurogener Differenzierungsmedien auf adhärent wachsende rMSZ und hMSZ getestet. Zum einen handelte es sich um das neurogene Differenzierungsmedium von der Firma *Promocell*, hier NDM PC genannt, und zum anderen um das neurogene Differenzierungsmedium der Firma *Cellular Engineering Technology*, NDM CET. Beide Hersteller gaben an, dass nach nur wenigen Stunden die ersten Zellen mit neuronaler Morphologie und neuronalem Phänotyp zu beobachten seien.

3.10.1 Neuronale Differenzierung von MSZ der Ratte

rMSZ verschiedener Passagen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % auf MG-beschichteten Deckgläschen bzw. T25-Zellkulturflaschen in rMSZ-Standardmedium inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und gegen NDM CET bzw. NDM PC ersetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt und so der Einfluss der NDM festgehalten.

Nach einer Inkubationszeit von 3 h mit NDM CET zeigten sich erste morphologische Veränderungen. Einige Zellkörper waren geschrumpft und diese Zellen hatten verzweigte Ausläufer gebildet. Einen Tag nach Zugabe des NDM CET waren nur noch wenige Zellen mit einer Neuronen-ähnlichen Morphologie zu beobachten und nach 2-tägiger Inkubation waren annähernd alle Zellen in ihre ursprüngliche Gestalt zurückgekehrt. Einige Zellen wiesen eine vakuoläre Morphologie auf, die vorher nicht zu sehen war.

Das neurogene Differenzierungsmedium von Promocell, NDM PC, induzierte innerhalb von 4 h eine deutliche Differenzierung vieler mesenchymaler Stammzellen in kleine runde Zellen mit zahlreichen Verästelungen. Nach 24-stündiger Inkubation waren nur noch wenige rMSZ mit neuronaler Morphologie zu finden und 48 h nach Zugabe des NDM PC waren fast alle Zellen wieder in ihre typische großflächige Gestalt zurückgekehrt. Einige Zellen waren abgestorben.

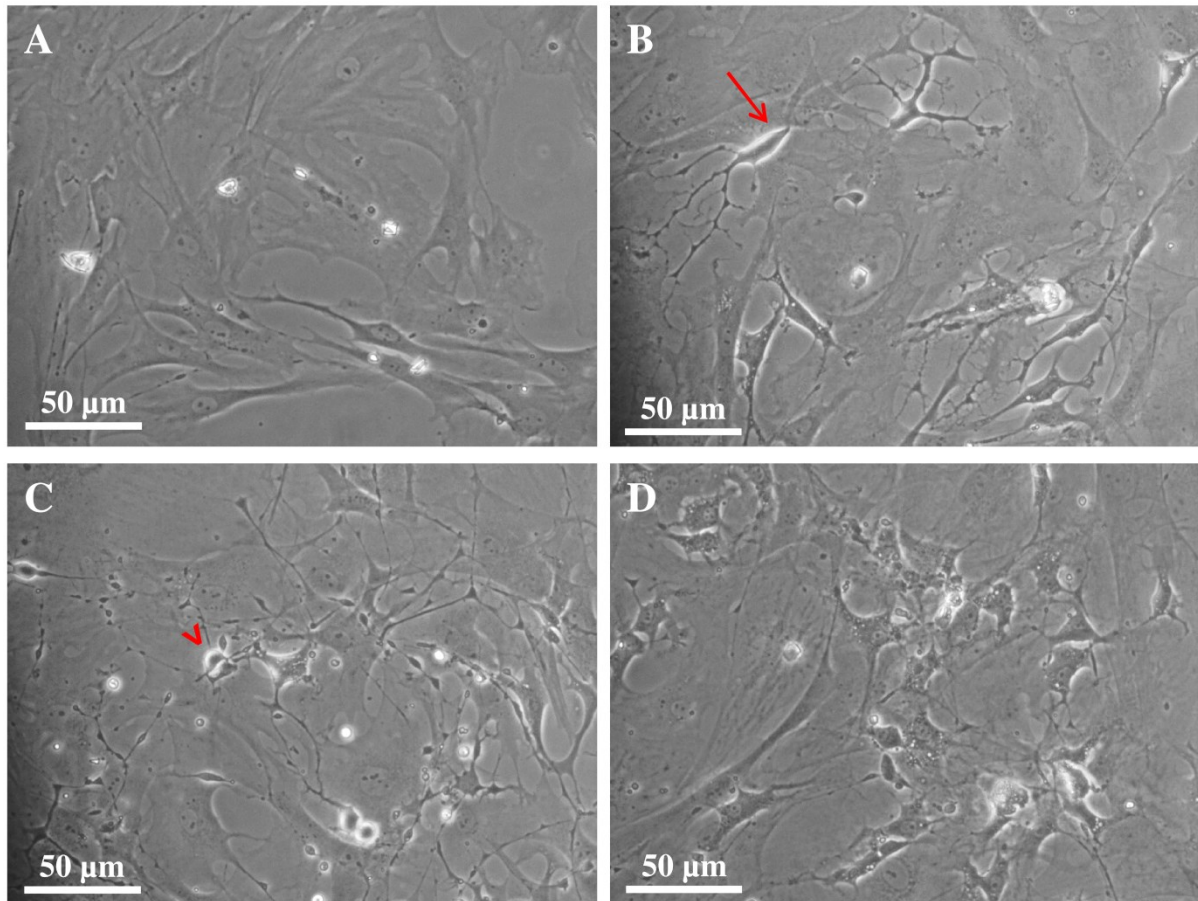


Abbildung 3.11: Inkubation der rMSZ mit dem neurogenen Differenzierungsmedium NDM CET.

(A) rMSZ unter Basalbedingungen vor Zugabe des NDM CET. (B) Nach 3-stündiger Inkubation mit dem NDM CET wiesen einige Zellen eine morphologische Veränderung auf. Der Zellkörper war geschrumpft und es hatten sich verzweigte Ausläufer gebildet (siehe Pfeil). (C) Nach 1-tägiger Inkubation mit NDM CET wiesen nur noch wenige Zellen eine veränderte Morphologie auf (siehe Pfeilspitze). (D) 2 Tage nach der Zugabe von NDM CET waren fast alle Zellen in ihre ursprüngliche Gestalt zurückgekehrt. Einige wiesen eine vakuoläre Morphologie auf. (Maßstab 50 µm)

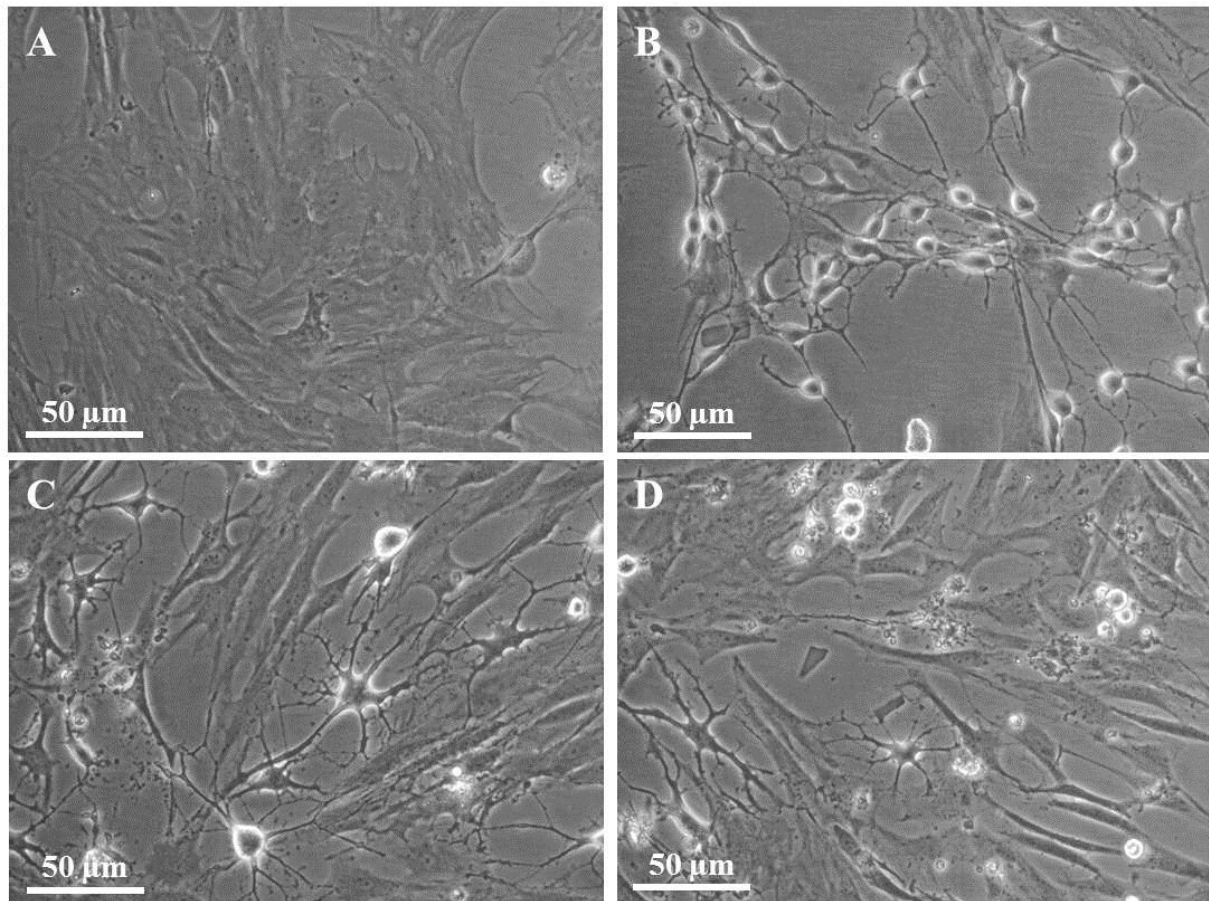


Abbildung 3.12: Inkubation der rMSZ mit dem neurogenen Differenzierungsmedium NDM PC.

(A) rMSZ unter basalen Kulturbedingungen vor Zugabe des NDM PC. (B) Nach einer Inkubation von 4 h mit NDM PC zeigte ein Großteil der Zellen eine neuronale Morphologie (runder Zellkörper mit vielen Verzweigungen). (C) 24 h nach Zugabe des NDM PC waren nur noch wenige Zellen mit neuronaler Morphologie zu finden. (D) Nach 48-stündiger Inkubation waren die meisten Zellen wieder in ihre typische großflächige Gestalt zurückgekehrt. (Maßstab 50 µm)

3.10.2 Neuronale Differenzierung von MSZ humanen Ursprungs

Im Folgenden wurden die hMSZ auf die Fähigkeit untersucht, eine neuronale Differenzierung einzugehen. Zellen unterschiedlicher Passagen wurden auf MG-beschichtete Deckgläschen oder T25-Zellkulturflaschen ausgesät und mit hMSZ-Medium kultiviert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten, wurde das Medium gegen NDM CET bzw. NDM PC ausgetauscht. Der Verlauf der Differenzierung wurde mittels mikroskopischer Aufnahmen beobachtet.

Drei Stunden nach Zugabe des NDM CET zeigten sich die ersten Zellen mit Neuronen-ähnlicher Morphologie (runde Zellkörper mit Verzweigungen). Nach 4,5-stündiger Inkubation hatte sich die Anzahl dieser Zellen erhöht. Im Vergleich zu den rMSZ konnten auch 24 h später noch morphologisch veränderte Zellen nachgewiesen werden.

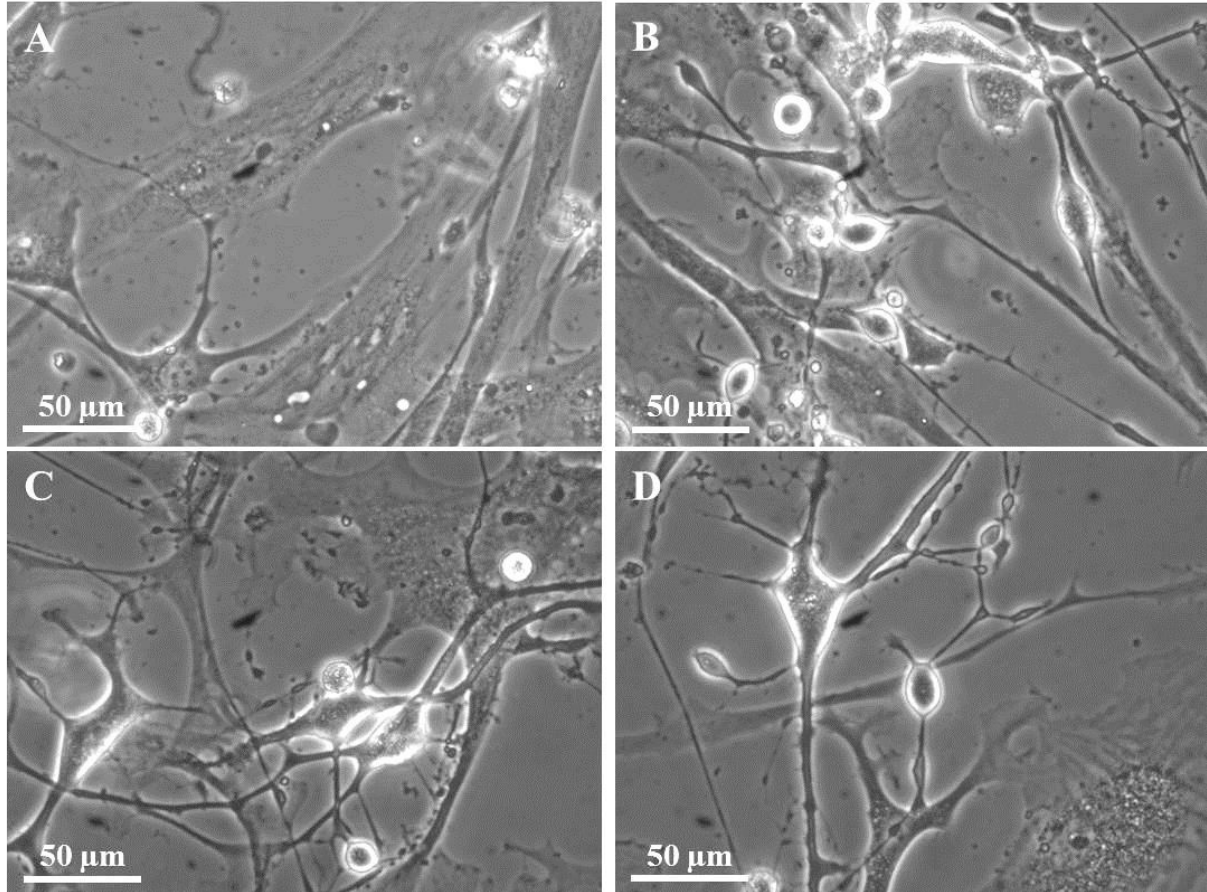


Abbildung 3.13: Inkubation von hMSZ mit dem neurogenen Differenzierungsmedium NDM CET.

(A) basale hMSZ vor Zugabe des NDM CET. (B) Nach 3-stündiger Inkubation mit NDM CET konnten die ersten Zellen mit geschrumpftem Zellkörper und Verzweigungen beobachtet werden. (C) 4,5 h nach Zugabe des NDM CET erhöhte sich die Anzahl dieser Zellen. (D) Auch 24 h nach Zugabe des NDM CET waren morphologisch veränderte Zellen zu finden. (Maßstab 50 µm)

Wie schon bei den rMSZ konnte auch bei den hMSZ eine Wirkung des NDM PC auf die neuronale Differenzierung festgestellt werden. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h waren die ersten Neuronen-ähnlichen Zellen zu beobachten. Die Anzahl dieser Zellen erhöhte sich mit zunehmender Inkubationsdauer. Nach 4,5-stündiger Kultivierung mit NDM PC zeigten sich zusätzlich zu den Neuronen-ähnlichen Zellen auch Zellen mit baumartiger Morphologie.

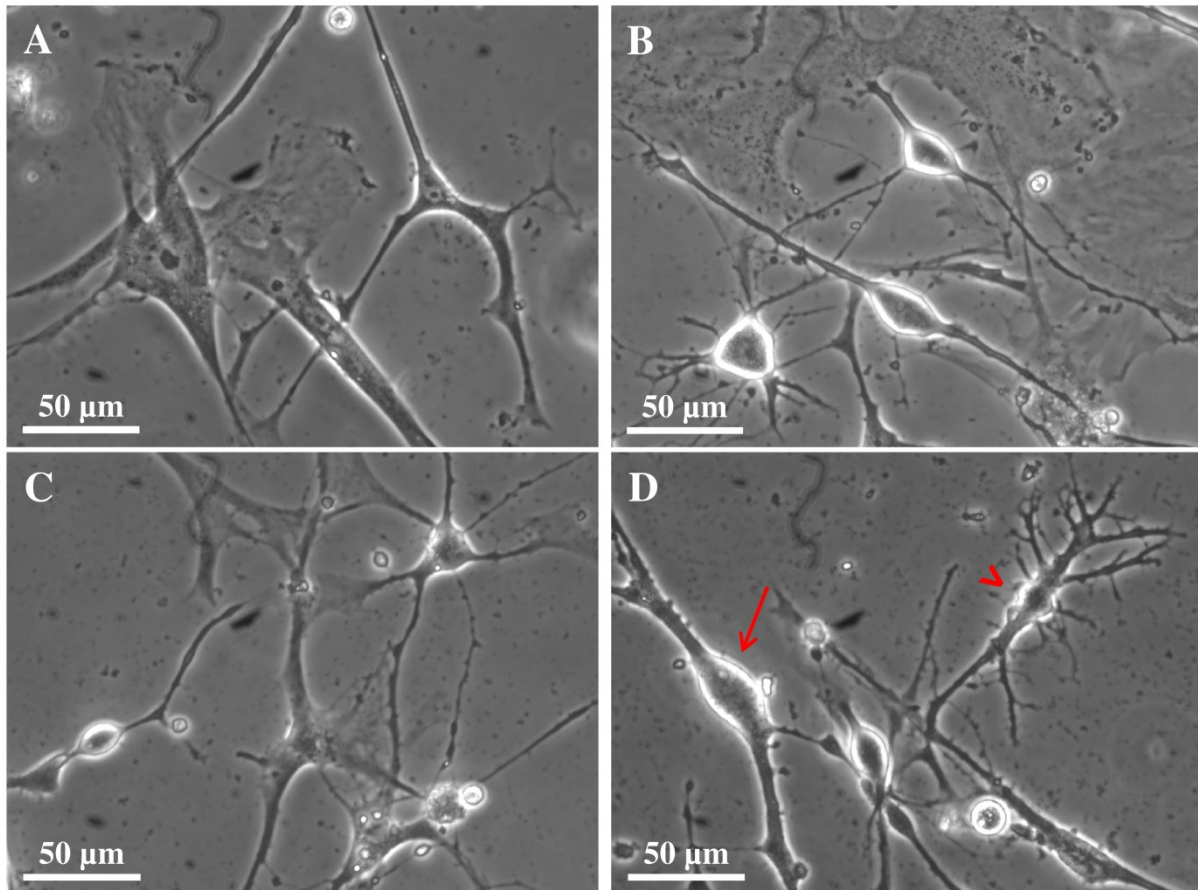


Abbildung 3.14: Inkubation von hMSZ mit dem neurogenen Differenzierungsmedium NDM PC.

(A) basale hMSZ vor Zugabe des NDM PC. (B) Nach 1,5-stündiger Inkubation mit NDM PC konnten die ersten Zellen mit geschrumpftem Zellkörper und Verzweigungen beobachtet werden. (C) 3 h nach Zugabe des NDM PC fand sich eine erhöhte Anzahl solcher Zellen. (D) Nach 4,5-stündiger Inkubation mit NDM PC waren sowohl Zellen mit neuronaler Morphologie (siehe Pfeil) als auch Zellen mit baumartiger Morphologie (siehe Pfeilspitze) zu sehen. (Maßstab 50 µm)

3.10.3 Neuroektodermale Marker in neuronal differenzierten rMSZ

Nachdem beide NDM zu sichtbaren morphologischen Veränderungen in den rMSZ führten, sollten diese auch auf Proteinebene hinsichtlich ihres neuroektodermalen Markerprofils untersucht werden. Dazu wurden die mit NDM CET bzw. NDM PC kultivierten Zellen fixiert und immunzytochemisch analysiert.

Eine 2-stündige Inkubation mit NDM CET ergab Zellen, die eindeutig positiv für β III Tubulin und NG2 waren. Sogar 24 Stunden nach Zugabe des Mediums konnte noch eine erhöhte Expression von β III Tubulin und NG2 nachgewiesen werden, allerdings zeigten die Zellen zu diesem Zeitpunkt nicht die für Neuronen und Oligodendrozyten typischen Morphologien.

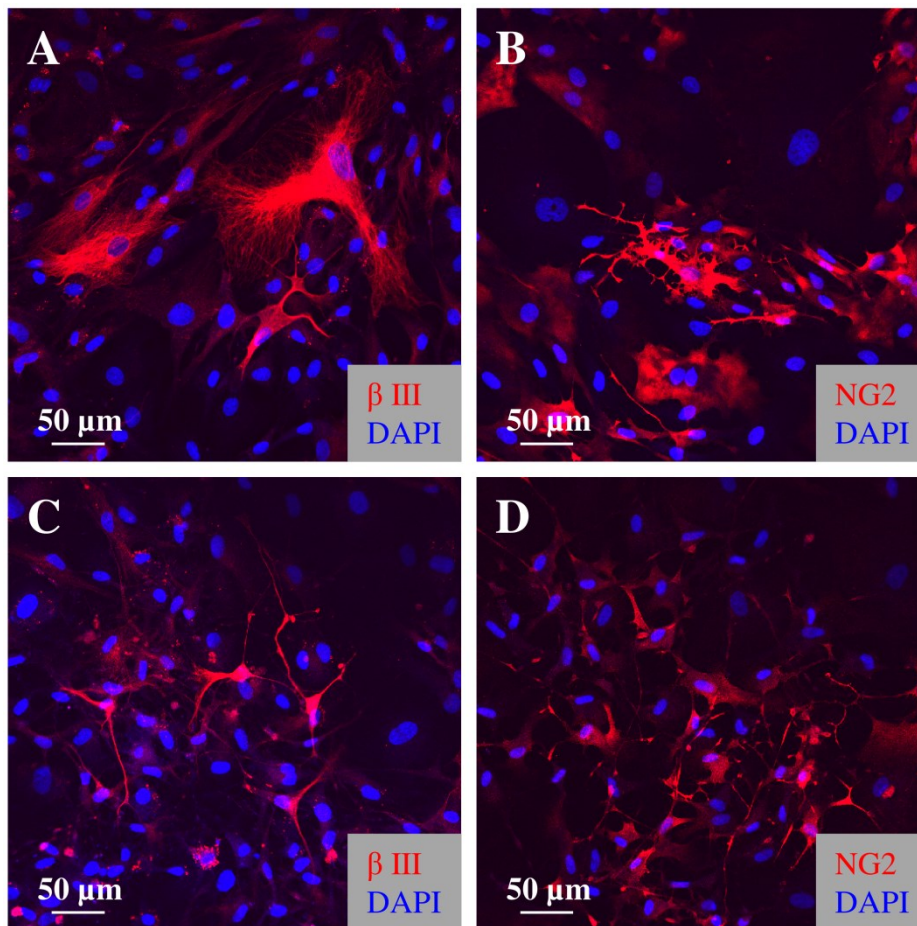


Abbildung 3.15: Nachweis neuroektodermaler Proteine nach Inkubation der rMSZ mit NDM CET.

Zwei Stunden nach Zugabe des NDM CET fanden sich (A) β III Tubulin-positive Zellen und (B) auch NG2-positive Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation konnte eine erhöhte Expression (C) von β III Tubulin bzw. (D) von NG2 detektiert werden, jedoch wiesen die Zellen nicht die für diese Marker typische Morphologie auf. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 μ m)

Auch die Inkubation mit NDM PC für 2 Stunden führte dazu, dass β III Tubulin-positive Zellen detektiert werden konnten. Abbildung 3.16 A zeigt zwei β III Tubulin-positive Zellen, die über einen langen Fortsatz miteinander verbunden sind, wie es auch für junge Neurone typisch ist. Außerdem konnten NG2-positive Zellen gefunden werden, die sich morphologisch nicht von jungen Oligodendrozyten in kortikalen Primärkulturen unterschieden. Nach 7-stündiger Kultivierung ließ sich immer noch eine erhöhte Expression von β III Tubulin und NG2 nachweisen, allerdings ohne die für Neurone und Oligodendrozyten typische Morphologie.

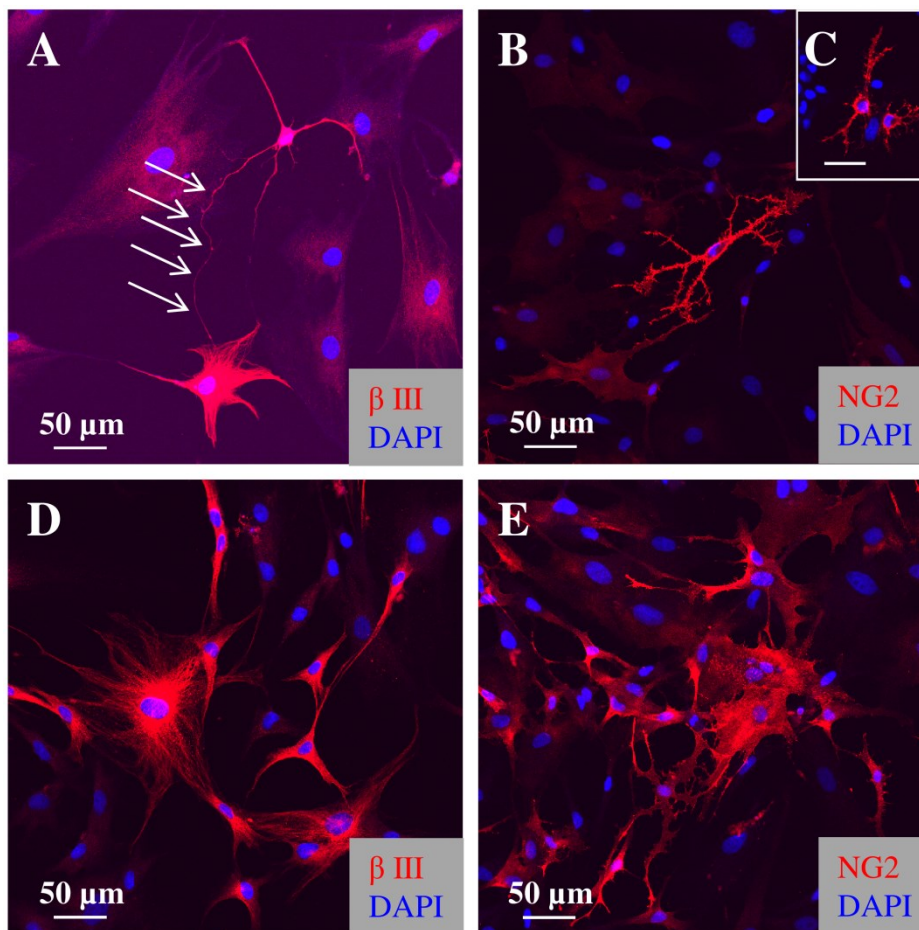


Abbildung 3.16: Nachweis neuroektodermaler Proteine nach Inkubation der rMSZ mit NDM PC.

Nach 2-stündiger Inkubation mit NDM PC konnten (A) β III Tubulin-positive Zellen und (B) NG2-positive Zellen detektiert werden. Die Pfeile in Bild (A) markieren einen langen dünnen Fortsatz wie er auch für junge Neurone in Kultur typisch ist. (C) zeigt als Vergleich NG2-positive Oligodendrozyten aus einer E18-Primärkultur, (Maßstab 20 μ m). Nach einer Inkubationsdauer von 7 h fanden sich Zellen mit erhöhter Expression von (D) β III Tubulin bzw. (E) von NG2 jedoch ohne die typische Morphologie. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 μ m)

3.10.4 Neuroektodermale Marker in neuronal differenzierten hMSZ

Wie schon im Kapitel 3.10.2 beschrieben, führten beide neurogenen Differenzierungsmedien zu sichtbaren morphologischen Veränderungen. Darauf folgend sollte mittels immunzytochemischen Färbungen untersucht werden, welchen Einfluss diese Medien auf das neuroektodermale Markerprofil der hMSZ hatte.

Die hMSZ wurden für 24 h mit dem NDM CET kultiviert und danach fixiert. Es ließen sich sowohl β III Tubulin-, NG2- als auch Nestin-positive Zellen nachweisen.

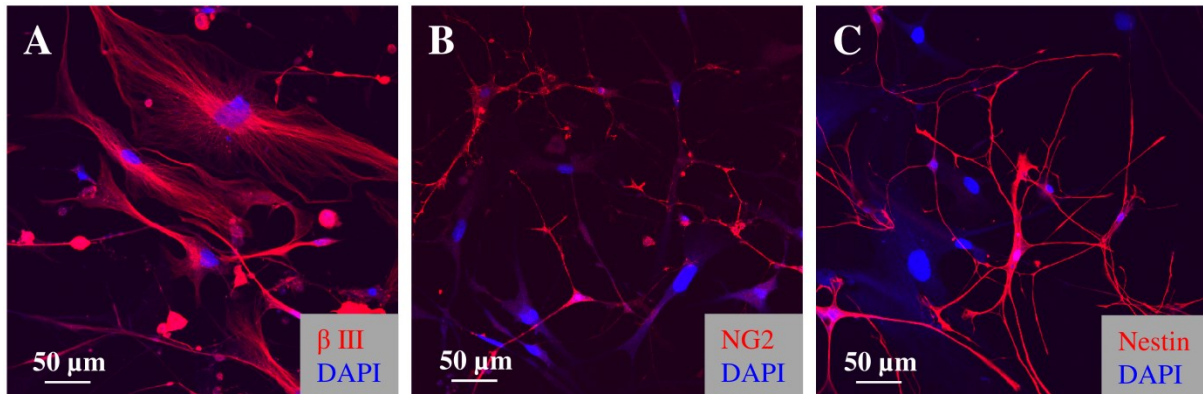


Abbildung 3.17: Immunzytochemischer Nachweis neuroektodermaler Proteine nach Inkubation der hMSZ mit NDM CET.

Nach 24-stündiger Inkubation mit NDM CET ließen sich (A) β III Tubulin-, (B) NG2- und (C) auch Nestin-positive Zellen nachweisen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 μ m)

Eine 4,5-stündige Inkubation mit NDM PC führte, wie schon in 3.10.2 erwähnt, zu eindeutigen morphologischen Veränderungen. Immunzytochemisch konnten wiederum β III Tubulin-, NG2- und Nestin-positive Zellen detektiert werden. Hierbei muss angemerkt werden, dass die NG2-positiven Zellen auch morphologisch den jungen Oligodendrozyten einer kortikalen Primärkultur stark ähnelten.

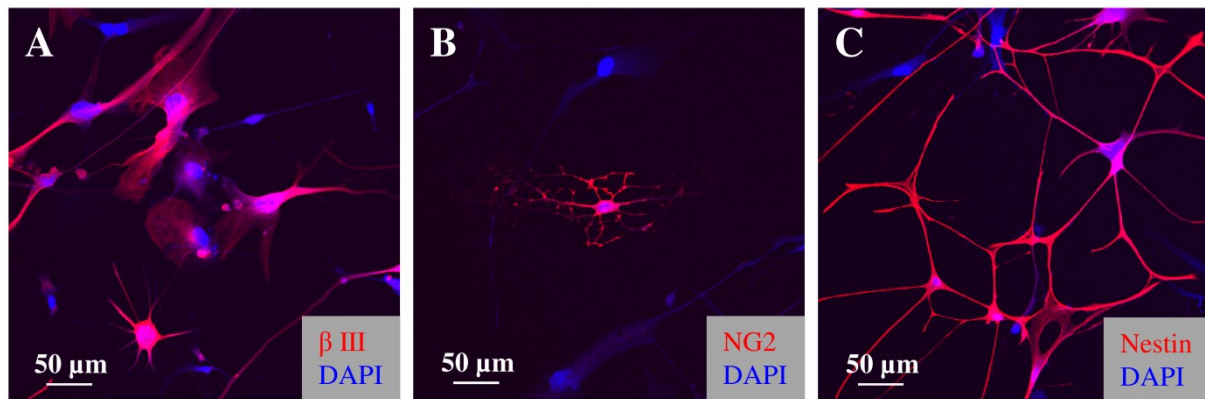


Abbildung 3.18: Immunzytochemischer Nachweis neuroektodermaler Proteine nach Inkubation der hMSZ mit NDM PC.

Nach einer Inkubationszeit von nur 4,5 h ließen sich (A) β III Tubulin-, (B) NG2- sowie (C) Nestin-positive Zellen nachweisen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 μ m)

3.11 *Time-Lapse*-Mikroskopie der rMSZ

Die *Time-Lapse*-Mikroskopie, auch als Videomikroskopie bekannt, ermöglicht es mithilfe einer Inkubationskammer, lebende Zellen über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Mit dieser Methode sollte der Einfluss der neurogenen Differenzierungsmedien genauer analysiert werden.

3.11.1 Basale adhärenente Kultivierungsperiode

Zuerst wurden rMSZ unter basalen adhärenenten Bedingungen untersucht, um so deren normales Verhalten zu verfolgen. Bei den rMSZ handelte es sich um hochmotile Zellen, die sich über die Oberfläche der Kulturplatten bewegten und stetig vermehrten. Morphologische Veränderungen konnten, abgesehen vom Zusammenziehen der Zellen kurz vor der Zellteilung, nicht beobachtet werden.

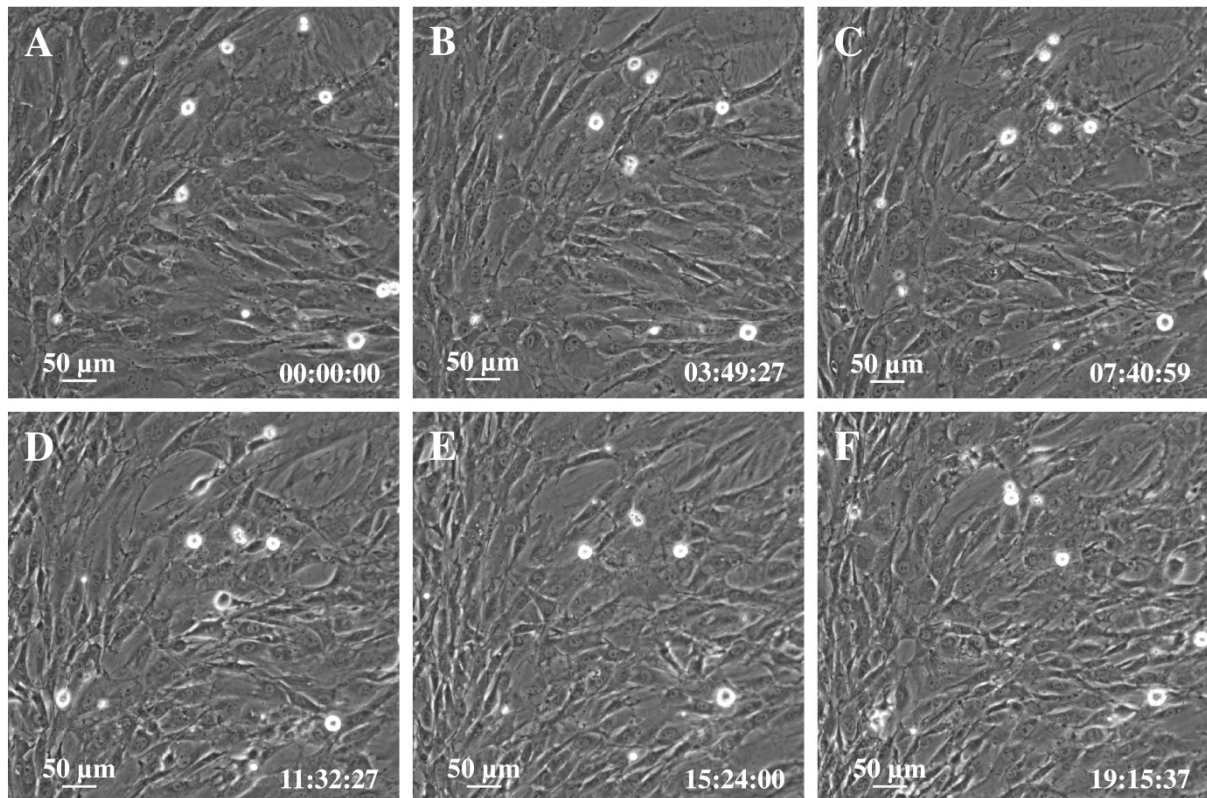


Abbildung 3.19: Video-Mikroskopie von rMSZ unter basalen Kulturbedingungen über einen Zeitraum von 19 h.

(A) bis (F) Während der basalen Kultivierungsphase konnte mittels live imaging gezeigt werden, dass es sich bei den rMSZ um motile Zellen handelte, die sich über die Zellkulturoberfläche bewegten und sich vermehrten. Eine morphologische Veränderung konnte nicht beobachtet werden. (Maßstab 50 µm)

3.11.2 Kultivierungsperiode mit NDM CET

Unter NDM CET-Einfluss ließ sich deutlich erkennen, wie die rMSZ nach nur 2 h ihre Gestalt veränderten. Die Zellkörper zogen sich zusammen und bildeten diverse Verästelungen, die wiederum fein verzweigt waren. Auffällig war jedoch, dass die morphologischen Veränderungen nicht von Dauer waren und viele Zellen in ihren Ausgangszustand zurückkehrten.

Im Unterschied zu den basalen rMSZ konnten allerdings keine Zellteilungen beobachtet werden.

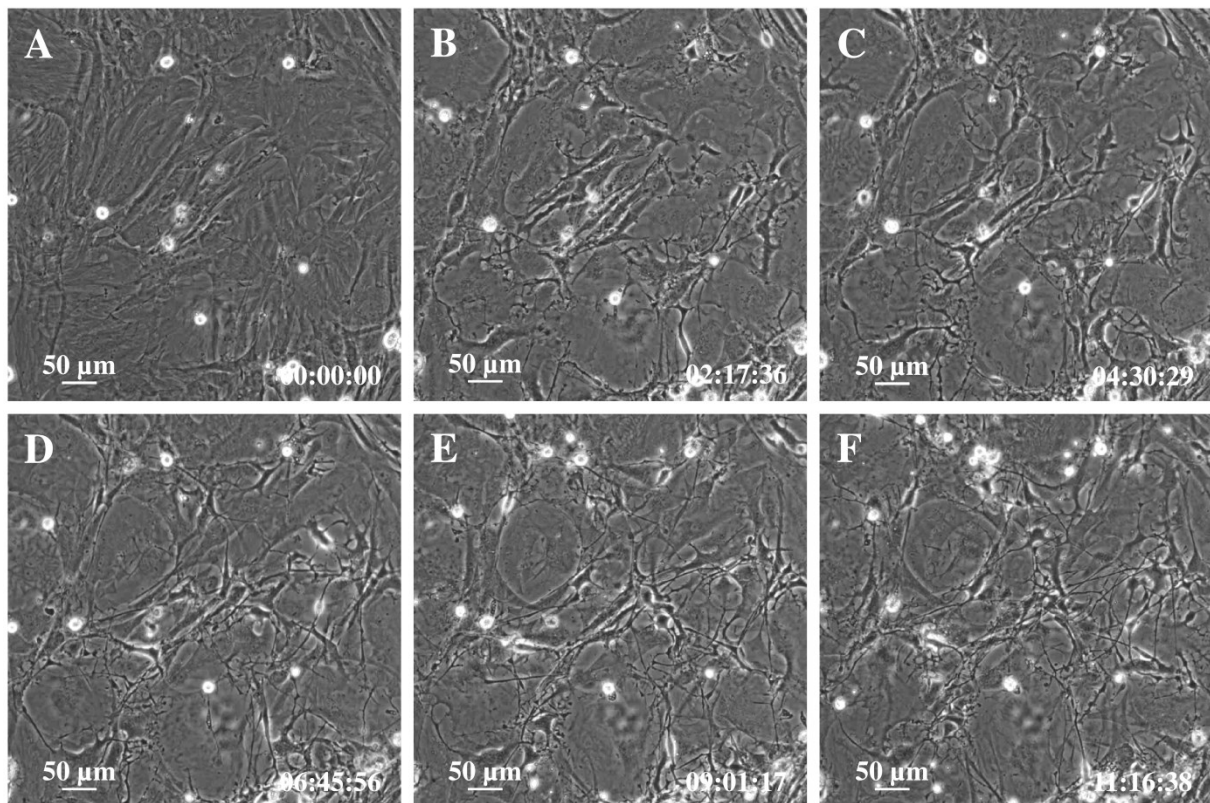


Abbildung 3.20: Video-Mikroskopie von rMSZ unter Einfluss von NDM CET über einen Zeitraum von 11 h.

(A) rMSZ zum Zeitpunkt 0 h vor der Zugabe von NDM CET, (B) bis (F) Verlauf der morphologischen Veränderung der rMSZ nach Zugabe des Differenzierungsmediums NDM CET. Deutlich zu erkennen ist das Schrumpfen der Zellkörper und die Ausbildung feiner Verästelungen vergleichbar mit neuronalen Zellen. (Maßstab 50 µm)

3.11.3 Kultivierungsperiode mit NDM PC

In gleicher Weise wurde die Wirkung von NDM PC auf adhärente rMSZ analysiert. Es konnten drei verschiedene Reaktionsmuster entdeckt werden. Bemerkenswerterweise verursachte dieses Differenzierungsmedium innerhalb weniger Minuten unverkennbare Veränderungen in der Morphologie der Zellen. Die Zellen schrumpften zu einem runden Zellkörper zusammen und bildeten Verzweigungen. Einige Zellen behielten diese neuronale Morphologie für mehrere Stunden, während andere nur kurzzeitig diese Form annahmen. Der dritte Typ veränderte sich überhaupt nicht, sondern verblieb in der für rMSZ typischen Gestalt.

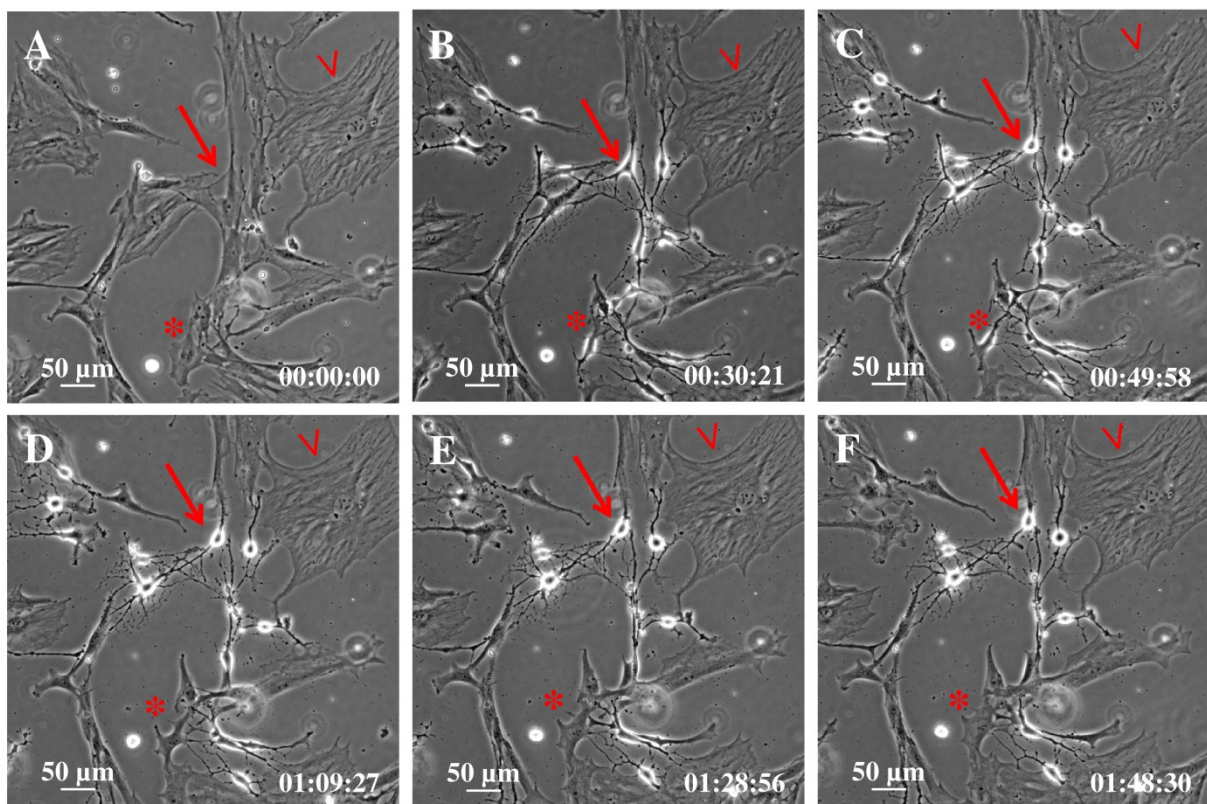


Abbildung 3.21: Video-Mikroskopie von rMSZ unter Einfluss von NDM PC über einen Zeitraum von 2 h.

(A) rMSZ unter basalen Kulturbedingungen zum Zeitpunkt 0 h vor der Zugabe von NDM PC. (B) Nach nur 30-minütiger Inkubation wiesen die ersten Zellen (siehe Pfeil) eine neuronale Morphologie auf. (C) bis (F) Einige der Zellen behielten diese neuronale Morphologie für mehrere Stunden (siehe Pfeil), während andere Zellen nur kurzzeitig (siehe *) oder gar nicht (siehe Pfeilspitze) ihre Gestalt veränderten. (Maßstab 50 µm)

3.12 *Time-Lapse*-Mikroskopie von hMSZ

3.12.1 Basale adhärenzte Kulturbedingungen

Auch die hMSZ wurden zuerst unter Basalbedingungen betrachtet, um deren normales Verhalten zu untersuchen. Diese Zellen bewegten sich über die Oberfläche der Kulturplatte, indem sie einen langgestreckten Ausläufer als Anker verwendeten und den Zellkörper in Richtung des Ausläufers zogen. Im Gegensatz zu den rMSZ waren nur wenige Zellteilungen zu beobachten, was abermals ein Beweis für die geringere Wachstumsgeschwindigkeit der hMSZ ist.

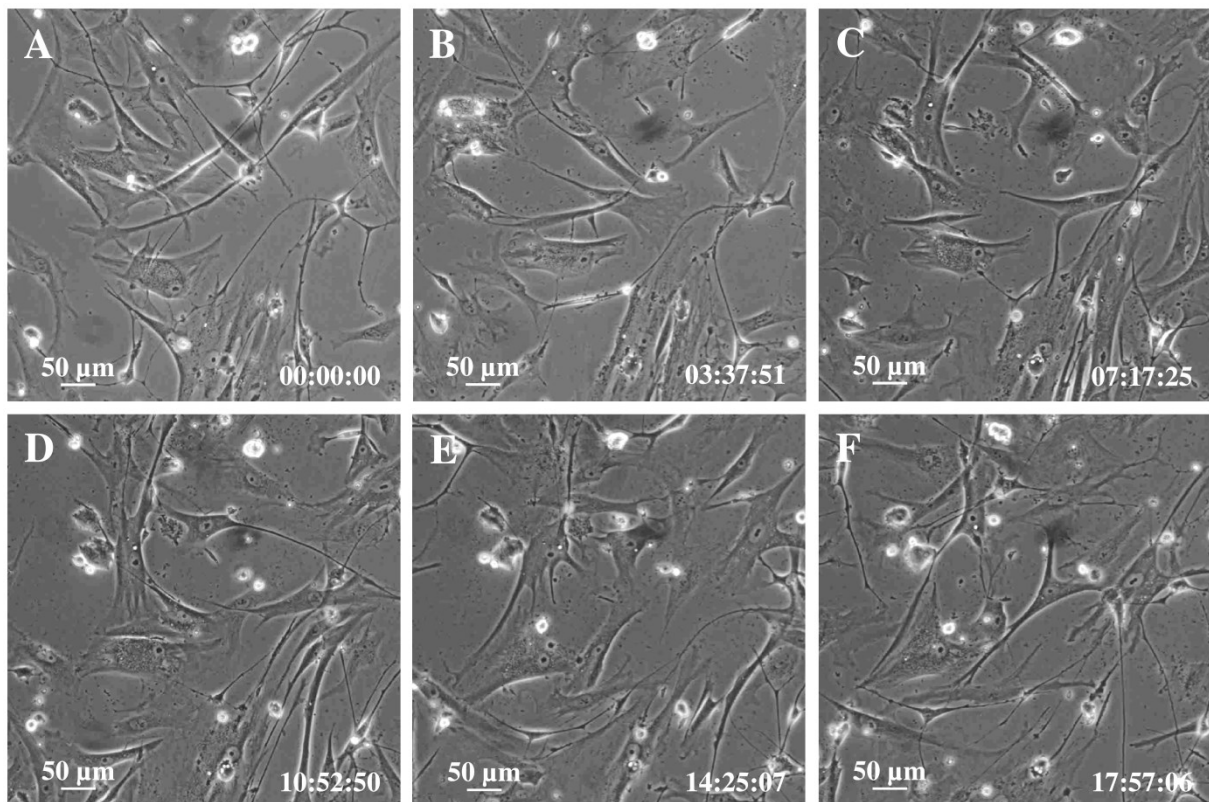


Abbildung 3.22: Video-Mikroskopie von hMSZ unter basalen Kulturbedingungen über einen Zeitraum von 18 h.

(A) Basale hMSZ zum Zeitpunkt 0 h. (B) bis (F) Bildausschnitte eines 18-stündigen Films. Man konnte beobachten, dass sich die Zellen morphologisch nicht veränderten. Sie waren jedoch recht motil und bewegten sich über die Oberfläche der Kulturplatte. (Maßstab 50 µm)

3.12.2 Kultivierung mit NDM CET

NDM CET führte bei den hMSZ ebenso zu Veränderungen in der Gestalt wie bei den MSZ aus der Ratte. Doch trat diese Wirkung erst nach 3 Stunden auf. Die Zellen zogen sich zusammen und bildeten Verästelungen, was ihnen ein neuronales Aussehen gab. Es war erkennbar, dass diverse Zellen über mehrere Stunden in diesem Zustand verblieben, während andere nur für kurze Zeit oder gar nicht ihr Erscheinungsbild veränderten.

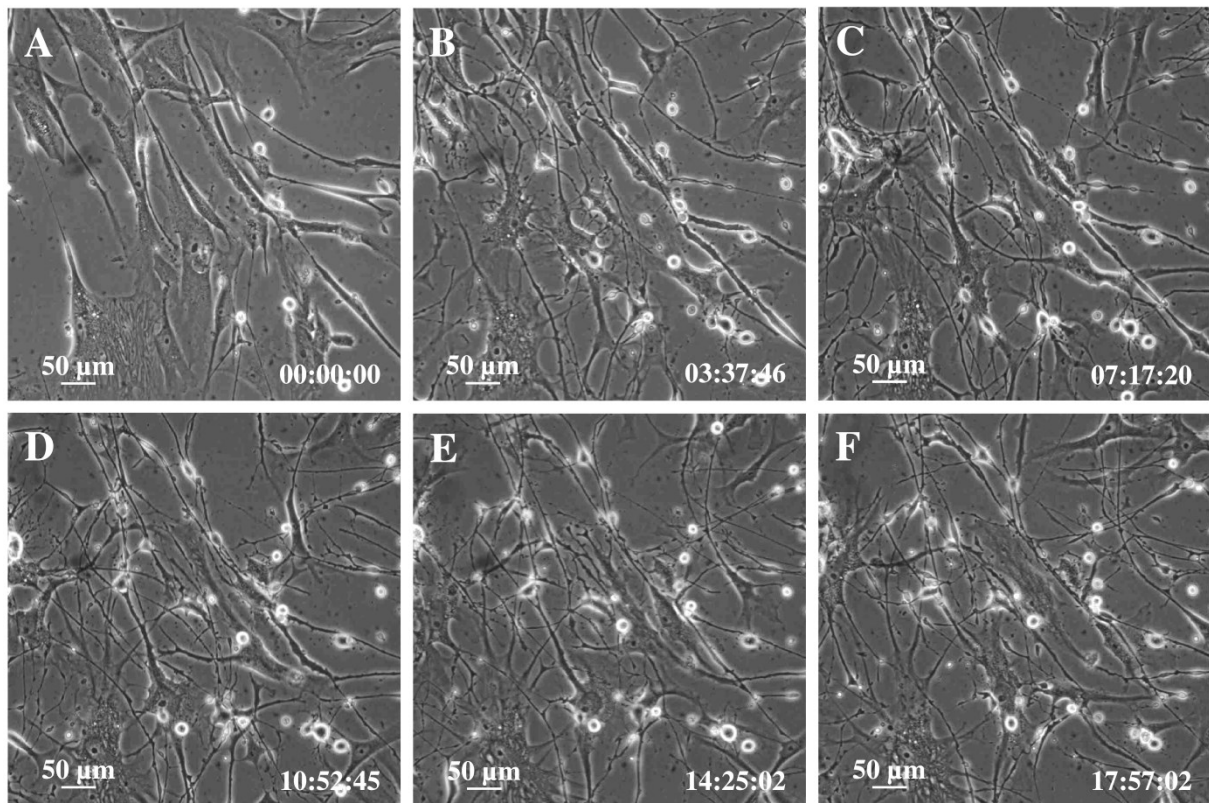


Abbildung 3.23: Video-Mikroskopie von hMSZ unter Einfluss von NDM CET über einen Zeitraum von 18 h.

(A) hMSZ zum Zeitpunkt 0 h vor Zugabe des NDM CET. (B) bis (F) Verlauf der morphologischen Veränderung über einen Zeitraum von 18 h. Die Zellkörper schrumpften und es bildeten sich Verästelungen. (Maßstab 50 µm)

3.12.3 Kultivierung mit NDM PC

Das Differenzierungsmedium NDM PC bewirkte bei den humanen MSZ ähnlich wie NDM CET nach ca. 3 h die ersten Veränderungen. Die Zellkörper der hMSZ begannen sich einzuschnüren und es bildeten sich Verzweigungen, die den Zellen eine neuronale Morphologie gaben. Nach 4,5 h Kultivierung kam es plötzlich zu einem vermehrten Auftreten von kleinen Schwebeteilchen in der Kulturschale. Dies korrelierte mit einem allmählichen Absterben der Zellen.

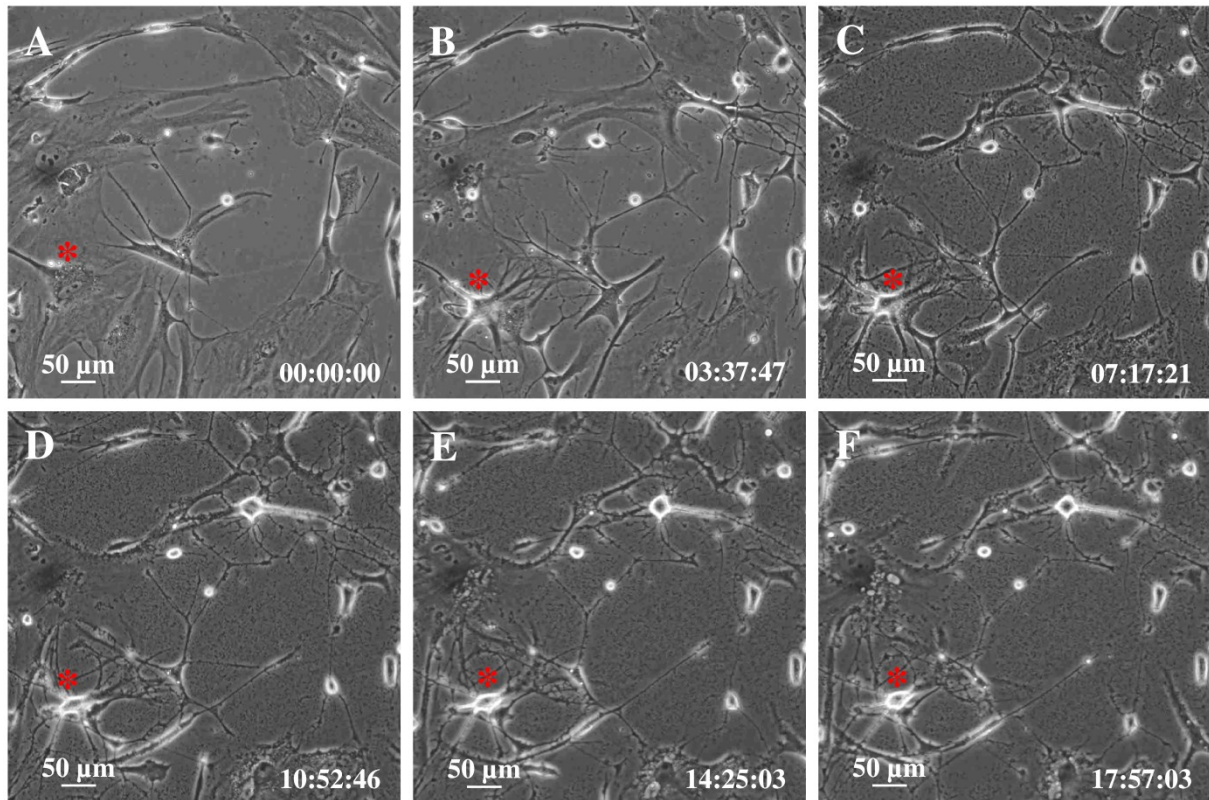


Abbildung 3.24: Video-Mikroskopie von hMSZ unter Einfluss von NDM PC über einen Zeitraum von 18 h.

(A) Basale hMSZ zum Zeitpunkt 0 h vor der Zugabe des NDM PC. (B) Nach ca. 3,5 h waren erste Verästelungen an Zellen zu beobachten, die Zellkörper begannen zu schrumpfen (siehe *). (C) bis (F) weiterer Verlauf der Veränderungen durch Inkubation der hMSZ mit NDM PC. (E) und (F) Zellen begannen abzusterben. (Maßstab 50 µm)

3.13 Einfluss der NDM auf rMSZ unter nicht-adhärenenten Kulturbedingungen

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss der beiden neurogenen Differenzierungsmedien auf die Induktion von Neurosphärulen gezeigt. Die rMSZ wurden zum einen mit NDM CET und zum anderen mit NDM PC für 24 h im Bioreaktor induziert. Danach wurden sie auf Deckgläschen ausgesät und für 2 bzw. 24 h im entsprechenden Medium weiterkultiviert.

Das NDM CET war, wie in Abbildung 3.25 zu sehen ist, in der Lage, Neurosphärulen zu generieren. Zwei Stunden nachdem die Sphärulen auf Deckgläschen ausgesät wurden, konnte man erkennen, dass die Zellen auf der Zellkulturschale angewachsen waren. Im Vergleich zu den rMSZ, die im rMSZ-Sphärulen-Standardmedium (siehe Abbildung 3.4) induziert wurden, befanden sich bedeutend mehr Einzelzellen in der Kultur. Dennoch konnte man typische Brombeer-artige Sphärulen beobachten. Diese waren innerhalb der folgenden Kultivierungszeit weiter abgeflacht und bildeten ein Netzwerk, welches stark an das neuronale Aussehen einer kortikalen Primärkultur erinnert.

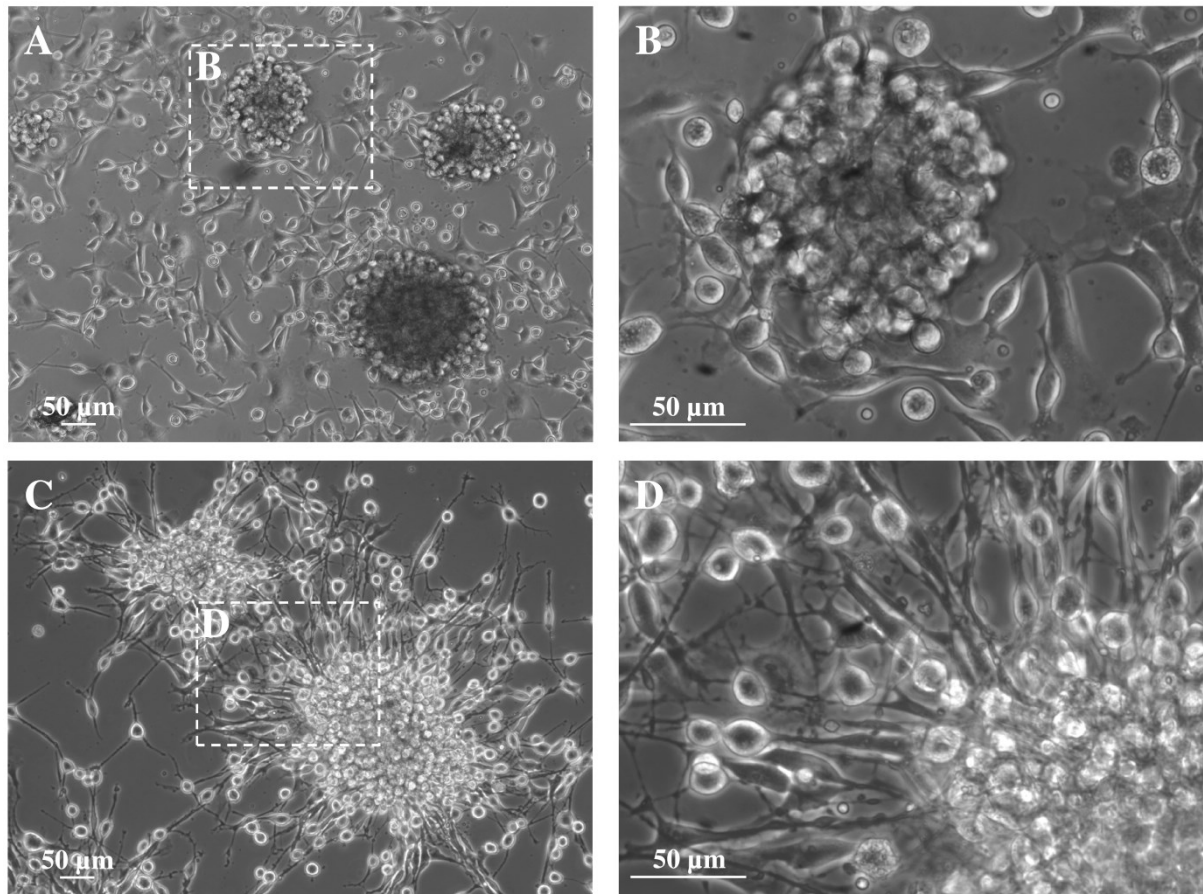


Abbildung 3.25: Induktion von Neurosphärulen aus rMSZ mit NDM CET.

Die Induktion der Neurosphärulen fand für 24 h im Bioreaktor statt. Danach wurden die Sphärulen auf Deckgläschen ausgesät und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. (A) Die Neurosphärulen wurden für 2 h auf Deckgläschen mit NDM CET weiterkultiviert. In dieser Zeit waren die Sphärulen angewachsen und hatten immer noch ihre runde Struktur. (B) Vergrößerung aus (A) Sphärulen waren noch sehr kompakt. (C) Nach 24 h auf Deckgläschen mit NDM CET waren die Sphärulen schon merklich abgeflacht und hatten ein feines Netzwerk ausgebildet. (D) Vergrößerung aus (C) Zellen zeigten neuronale Morphologie. (Maßstab 50 µm)

Im Anschluss daran wurden die immunzytochemischen Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden die Deckgläschen nach 2 h bzw. 24 h fixiert und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Nach 2-stündiger Inkubation auf dem Deckgläschen konnten Nestin in der Mitte der Sphärulen und NG2 im Randbereich der Sphärulen nachgewiesen werden. Gut erkennbar war, dass eine adhärenzte Weiterkultivierung für 24 h ein Auswachsen der Zellen aus den Sphärulen nach sich zog. Die Nestinexpression ging allerdings verloren, während NG2 immer noch exprimiert wurde und zwar hauptsächlich von Zellen im Randbereich der Sphärulen bzw. von Zellen, die aus den Sphärulen auswuchsen.

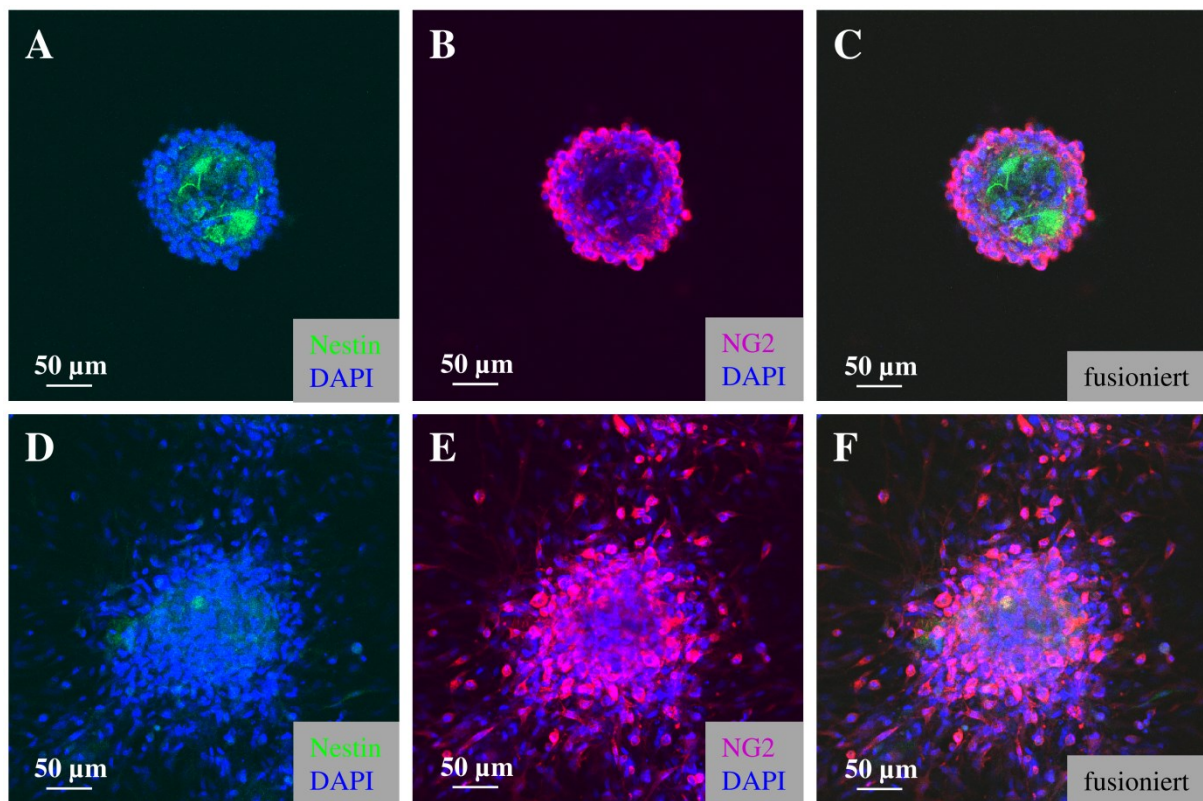


Abbildung 3.26: Expression neuroektodermaler Marker in rMSZ-Sphärulen nach Induktion in NDM CET.

Die Sphärulen wurden für 24 h im Bioreaktor induziert und dann für 2 h (A bis C) auf Deckgläschen mit NDM CET weiterkultiviert. Es hatten sich noch keine Verzweigungen gebildet. (A) Nestin wurde in der Mitte der Sphärule exprimiert, (B) NG2 hauptsächlich am Randbereich. (C) fusioniertes Bild, keine Kolokalisation. (D) bis (F) zeigt eine Neurosphäre, die für 24 h auf dem Deckgläschen in NDM CET weiterkultiviert wurde. (D) keine Nestinexpression, (E) NG2 exprimierende Zellen befanden sich hauptsächlich am Randbereich und in den Zellen, die aus der Sphärule auswuchsen. (F) fusioniertes Bild. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 µm)

Im Gegensatz dazu war das NDM PC nicht geeignet, um Neurosphärulen aus rMSZ zu induzieren. Die 2-stündige Kultivierung auf Deckgläschen zeigte, dass nur noch wenige vitale Zellen in dieser Kultur existierten. Die wenigen Zellcluster ähnelten in keiner Weise dem Aussehen von Neurosphärulen. Die Abbildungen 3.27 C und D zeigen eine Sphärule, die zwar einige Verzweigungen ausgebildet hatte, aber nicht sonderlich vital aussah.

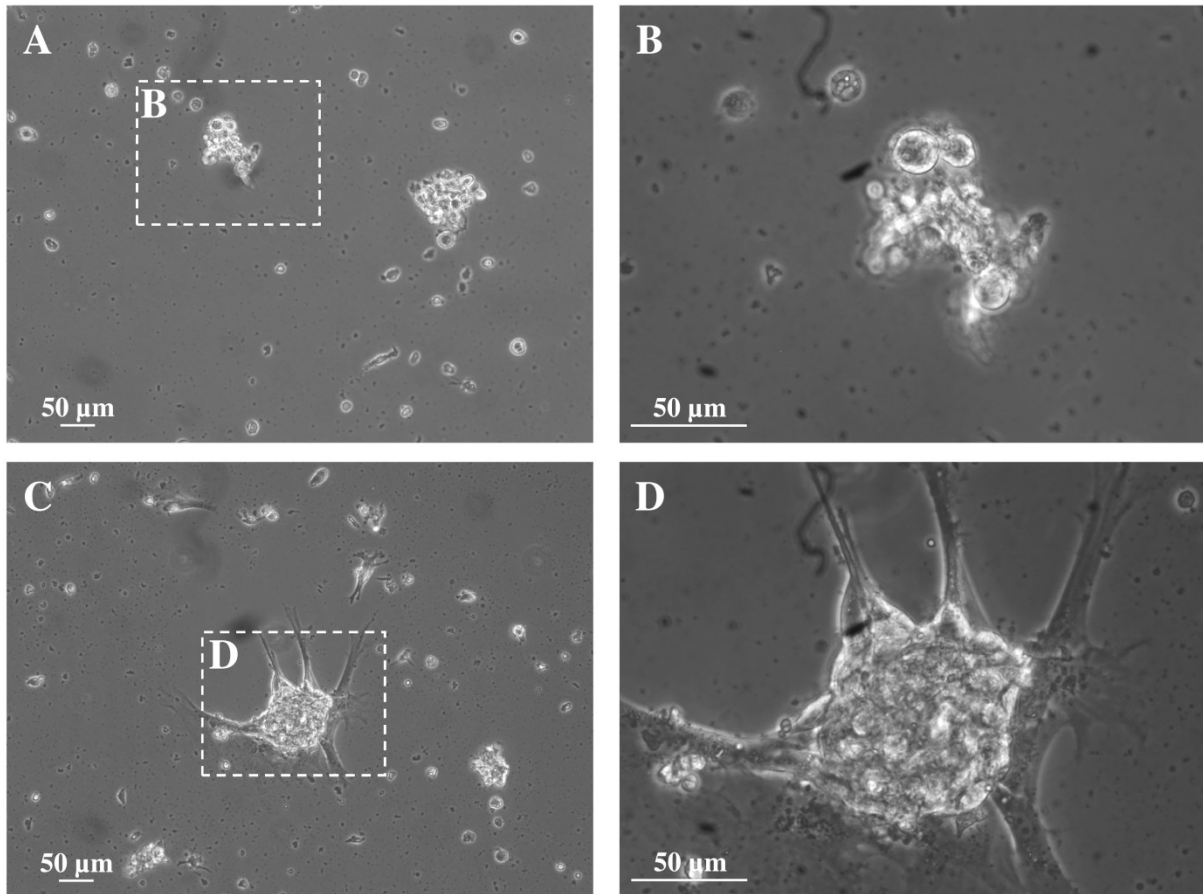


Abbildung 3.27: Induktion von Neurosphärulen aus rMSZ mit NDM PC.

Das Wachstum der Sphärulen wurde für 24 h im Bioreaktor induziert. Danach wurden sie auf Deckgläschen ausgesät. (A) 2 h nach der Aussaat auf Deckgläschen mit NDM PC ließen sich nur wenige Sphärulen nachweisen. (B) Vergrößerung aus (A) zeigt, dass die Zellen nicht sehr vital aussahen. (C) Nach 24-stündiger Kultivierung auf Deckgläschen mit NDM PC fanden sich Sphärulen mit einigen wenigen Verzweigungen. (D) Vergrößerung aus (C). (Maßstab 50 µm)

Auch die immunzytochemischen Färbungen machten deutlich, dass nach Behandlung mit NDM PC kaum noch lebende Zellen übrig blieben. Vergleicht man die Abbildung 3.28 mit der Abbildung 3.26 D – F, dann lässt sich erkennen, dass sich die rMSZ-Sphärulen mit NDM PC aus weniger Zellen (siehe blau angefärbte DAPI-Kerne) zusammensetzten und auch kaum Zellen aus der Sphärule ausgewachsen waren. Außerdem konnte nur eine sehr geringe Nestinexpression sowie NG2-Expression nachgewiesen werden.

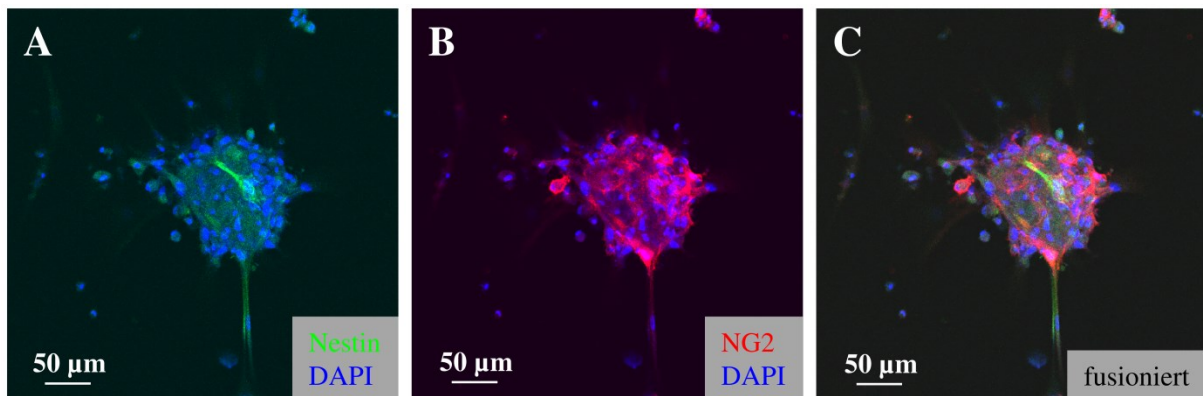


Abbildung 3.28: Expression neuroektodermaler Marker in rMSZ-Sphärulen nach Induktion in NDM PC.

Die rMSZ-Sphärulen wurden für 24 h im Bioreaktor mit NDM PC induziert. Anschließend wurden sie auf Deckgläschen ausgesät und für 24 h mit NDM PC weiterkultiviert. (A) Sehr geringe Nestinexpression. (B) NG2 exprimierende Zellen. (C) Das fusionierte Bild von (A) und (B) zeigt, dass es keine Kolokalisation von Nestin und NG2 gab. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 µm)

3.14 *Time-Lapse*-Mikroskopie von rMSZ-Sphärulen

Um einen detaillierteren Eindruck vom Auswachsen der rMSZ-Sphärulen zu bekommen, wurde erneut die Video-Mikroskopie verwendet. Die rMSZ wurden für 24 h im Bioreaktor entweder mit dem rMSZ-Sphärulen Standardmedium oder mit dem NDM CET induziert. Danach wurden die so generierten Sphärulen auf MG-beschichtete Deckgläschen ausgesät und im entsprechenden Medium über mehrere Stunden weiterkultiviert. Da die nicht-adhärenente Kultivierung der rMSZ mit NDM PC zeigte, dass eine Induktion mit diesem Medium nicht geeignet ist (siehe Kapitel 3.13), wurde für diese Kulturbedingung auf die Video-Mikroskopie verzichtet.

3.14.1 rMSZ-Sphärulen unter basalen Kulturbedingungen

Eine Weiterkultivierung der zuvor unter nicht-adhärenenten Kulturbedingungen induzierten Sphärulen auf Deckgläschen, also unter adhärenenten Bedingungen, bewirkte ein An- und Auswachsen der Sphärulen. Nach ca. 3,5 h hatten die rMSZ-Sphärulen eine geeignete Stelle auf dem MG-beschichteten Deckgläschen gefunden. Sie begannen in den darauf folgenden Stunden einen Kontakt zum Untergrund herzustellen. Nach etwas mehr als 7 h konnten die ersten aus den Sphärulen auswachsenden Zellen beobachtet werden. In den weiteren Stunden bildete sich ein kranzförmiger Zellrasen, der zunehmend dichter und größer wurde. Gut erkennbar war auch, dass der Durchmesser der rMSZ-Sphärulen im Laufe der Zeit abnahm, während der Zellrasen, der die für rMSZ typische Fibroblasten-ähnliche Morphologie aufwies, sich weiter ausbreitete.

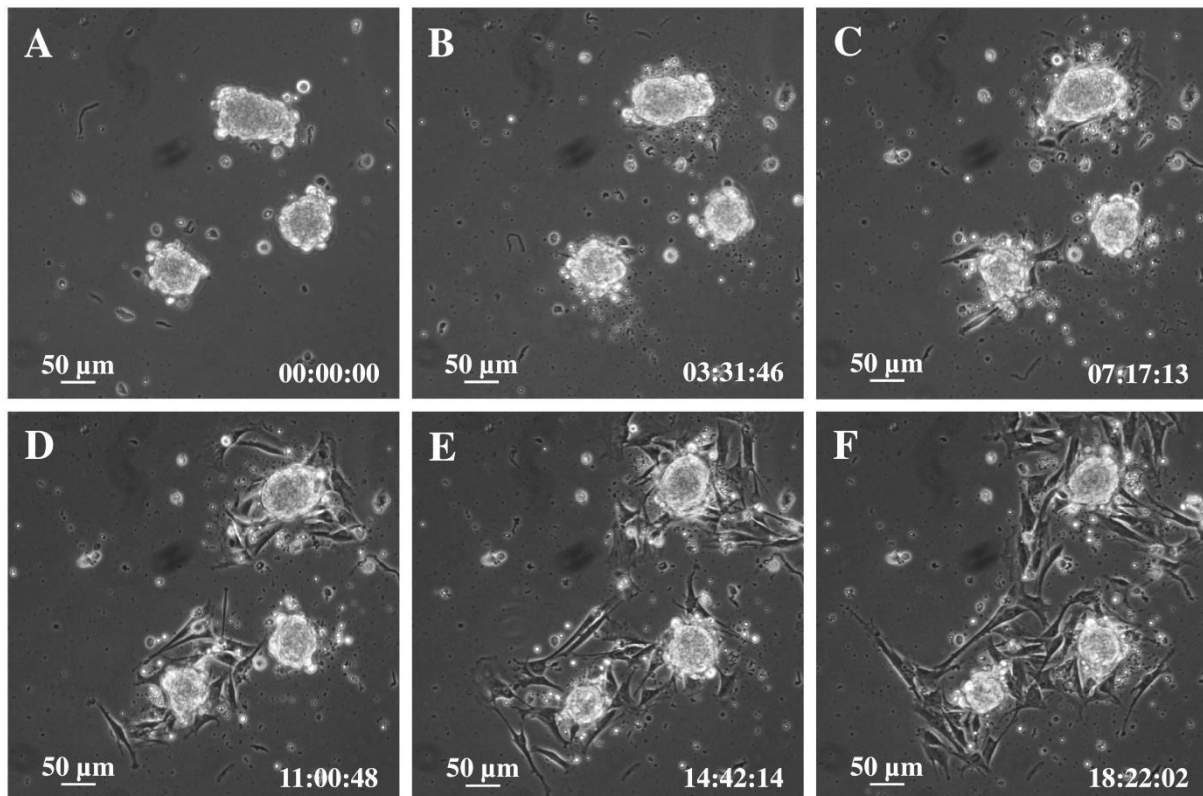


Abbildung 3.29: Video-Mikroskopie von rMSZ-Sphärulen unter basalen Kulturbedingungen in rMSZ-Sphärulen-Standardmedium über einen Zeitraum von 18,5 h.

Die Sphärulen wurden für 24 h im Bioreaktor mit rMSZ-Sphärulen-Standardmedium induziert und danach auf Deckgläschen im gleichen Medium weiterkultiviert. Das An- bzw. Auswachsen der rMSZ-Sphärulen wurde über mehrere Stunden gefilmt. (A) stellt die Sphärulen direkt nach Aussaat auf das Deckgläschen dar. (B) Nach 3,5 h waren die Sphärulen auf dem Deckgläschen angewachsen. (C) Die ersten Zellausläufer bildeten sich erst nach ca. 7 h. (D) bis (F) zeigt die Ausbildung weiterer Ausläufer. Die Sphärulen wurden kleiner in ihrem Durchmesser. Die ausgewachsenen Zellen zeigten die für rMSZ typische Fibroblasten-ähnliche Morphologie. (Maßstab 50 µm)

3.14.2 rMSZ-Sphärulen mit NDM CET

Dass es möglich war, rMSZ-Sphärulen mit NDM CET zu induzieren, konnte schon das Kapitel 3.13 veranschaulichen. In diesem Abschnitt soll nun gezeigt werden, wie sich die Sphärulen nach dem Aussäen auf MG-beschichtete Deckgläschen verhielten. Dabei wurden sie weiterhin im NDM CET kultiviert. Im Vergleich zu den basalen Sphärulen (siehe 3.14.1) hatten die NDM CET Sphärulen schneller Kontakt mit der Zellkulturschale hergestellt und die Zellen begannen schon nach 3,5 h mit dem Auswachsen. In den darauf folgenden Stunden konnte beobachtet werden, dass der adhärenente Zellrasen stetig größer wurde und der Durchmesser der Sphärulen gleichzeitig abnahm. Interessanterweise wiesen die ausgewachsenen Zellen jedoch nicht die typische Fibroblasten-ähnliche Morphologie der rMSZ auf, sondern besaßen eine stärker verzweigte Gestalt.

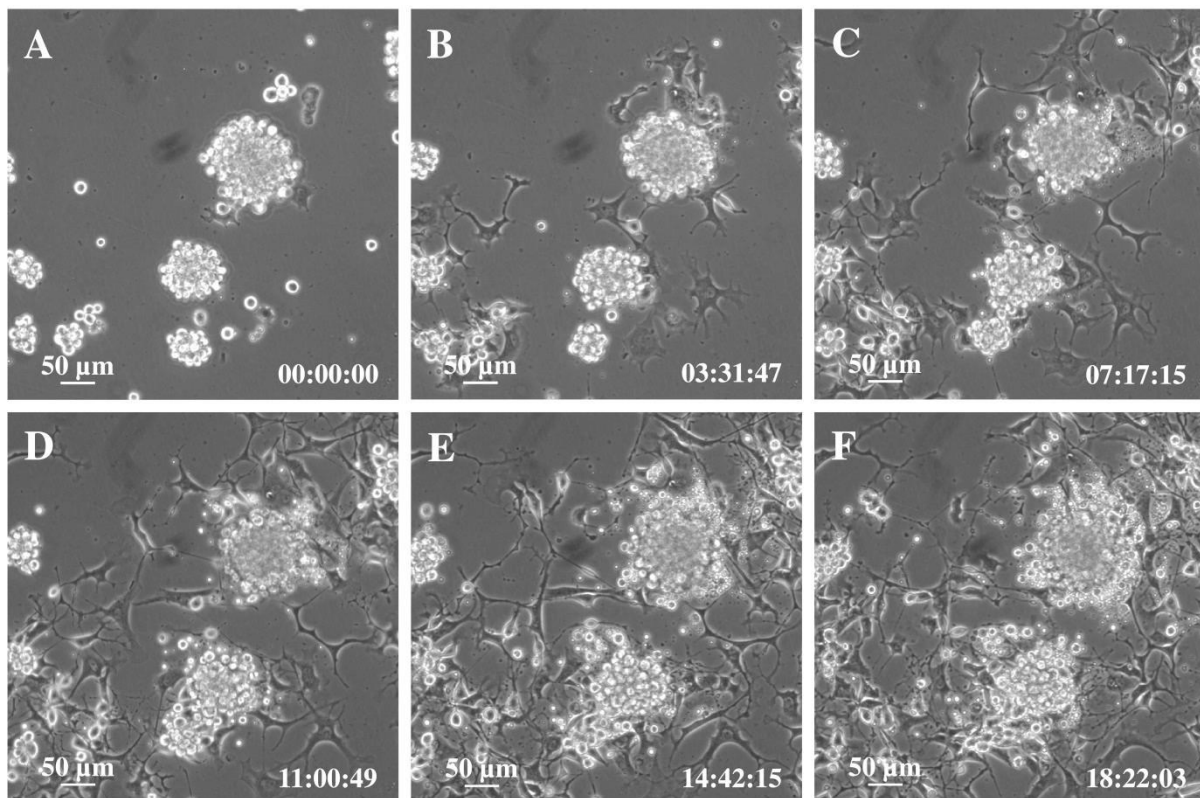


Abbildung 3.30: Video-Mikroskopie von rMSZ-Sphärulen unter Einfluss von NDM CET über einen Zeitraum von 18,5 h.

Die Sphärulen wurden für 24 h im Bioreaktor mit NDM CET induziert und anschließend auf Deckgläschen im gleichen Medium weiterkultiviert. Das An- bzw. Auswachsen der rMSZ-Sphärulen wurde über mehrere Stunden gefilmt. (A) stellt die Sphärulen direkt nach Aussaat auf das Deckgläschen dar. (B) Nach 3,5 h waren die Sphärulen auf dem Deckgläschen angewachsen und hatten erste Ausläufer gebildet. (C) bis (F) zeigt die Ausbildung weiterer Ausläufer bzw. das Auswachsen der Sphärulen. Die Sphärulen wurden kleiner in ihrem Durchmesser. Die ausgewachsenen Zellen waren stärker verzweigt als die der basalen Sphärulen. (Maßstab 50 µm)

3.15 Ko-Kultivierung von rMSZ mit kortikalen Primärkulturen

In diesem Abschnitt wird die Frage bearbeitet, ob es möglich ist auch ohne spezielle Medien ähnliche Differenzierungsphänomene, wie in Kapitel 3.10.1 beschrieben, auszulösen. Zu diesem Zweck wurden die rMSZ für 48 h mit 5-Brom-2-Desoxyuridin (BrdU) kultiviert. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, welches während der S-Phase des Zellzyklus an Stelle von Thymidin in den neu synthetisierten DNS-Strang inkorporiert. Mit spezifischen Antikörpern kann es dann nachgewiesen werden. Eine derartig markierte Zelle besitzt nun einen BrdU-positiven Zellkern. Im Anschluss an die Markierung wurden die rMSZ zusammen mit kortikalen Primärkulturzellen kokultiviert. Mittels immunzytochemischer Färbungen wurde untersucht, ob eine Differenzierung der rMSZ stattgefunden hat.

Es stellte sich heraus, dass auch unter diesen Bedingungen (Ko-Kultivierung für 24 h) mesenchymale Stammzellen der Ratte in NG2-positive Zellen differenzierten. Diese konnten morphologisch nicht von jungen Oligodendrozyten der kortikalen Primärkultur unterschieden werden.

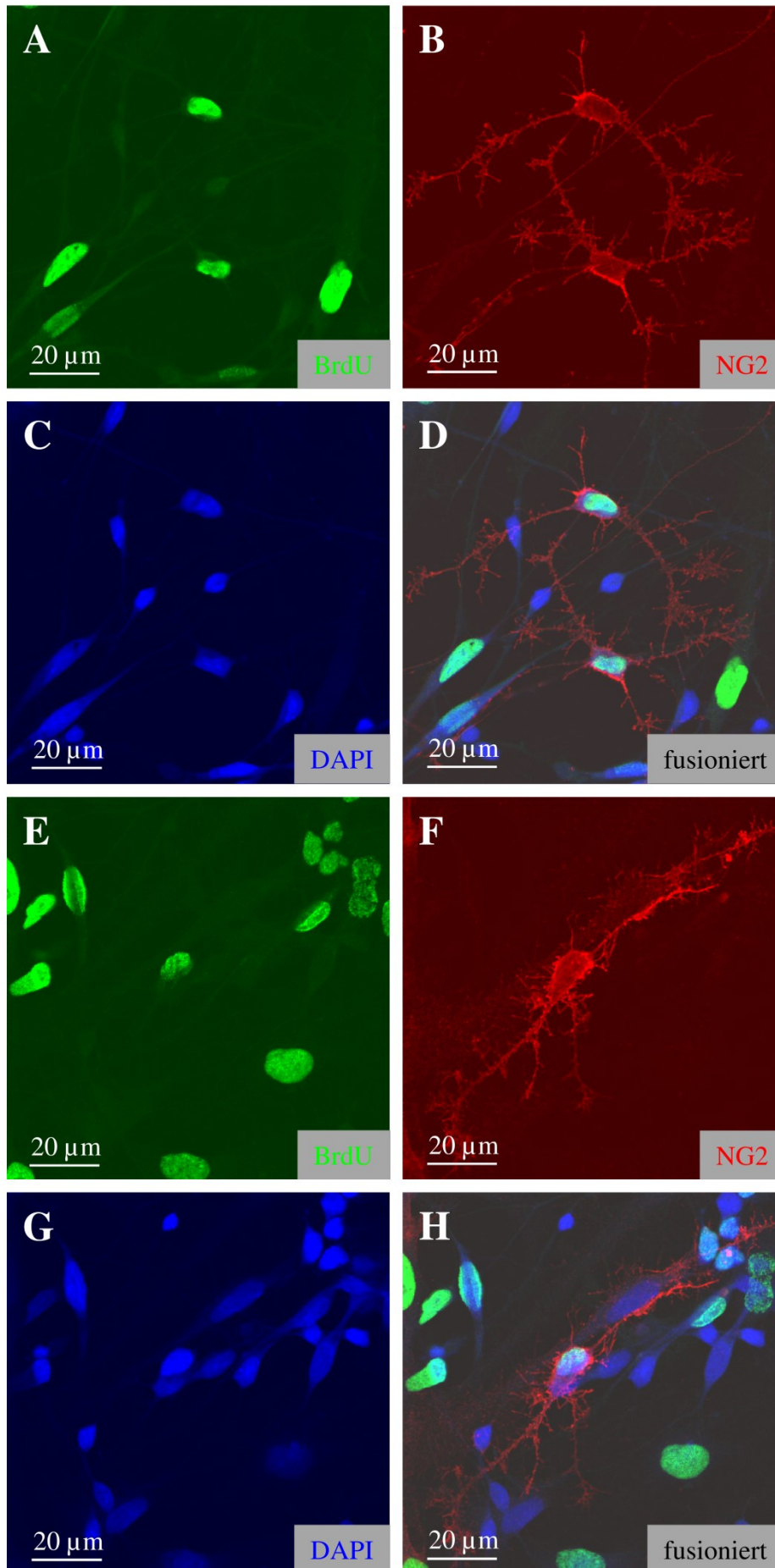


Abbildung 3.31:

Kokultivierung von E18-PKZ und rMSZ für 24 h.

Die rMSZ wurden vor der Kokultivierung 48 h mit BrdU kultiviert.

(A) BrdU-positive rMSZ (grün),

(B) NG2-positive Zellen (rot),

(C) die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

(D) Fusioniertes Bild aus (A) bis (C) Die NG2-positiven Zellen waren mit BrdU kolokalisiert.

Das bedeutet, dass es sich bei den NG2 exprimierenden Zellen um rMSZ handelte.

(E) bis (G) weiteres Beispiel für NG2-positive rMSZ.

(Maßstab 20 µm)

Weiterhin konnten durch die 48-stündige Ko-Kultivierung Nestin-positive Zellen, die BrdU koexprimierten, nachgewiesen werden.

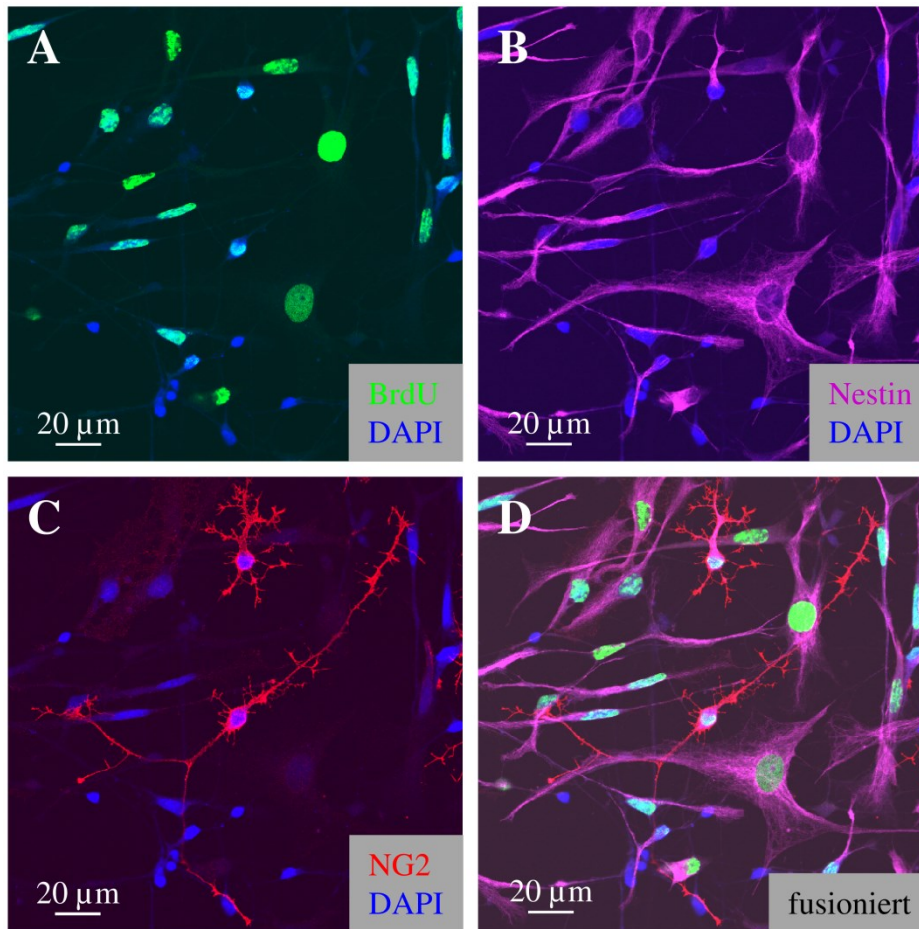


Abbildung 3.32: Nestin- und NG2-positive rMSZ nach Kokultivierung mit E18-PKZ für 48 h.

Die rMSZ wurden vor der Kokultur 48 h mit BrdU kultiviert. (A) BrdU-positive rMSZ in grün. DAPI-Kerne in blau. (B) Nestin-positive Zellen in violett, DAPI-Kerne in blau. (C) NG2-positive Zellen in rot, DAPI-Kerne in blau. (D) Fusioniertes Bild aus (A) bis (C) Sowohl Nestin- als auch NG2-positive Zellen waren mit BrdU kolokalisiert. Das bedeutet, dass es sich bei den Nestin- bzw. NG2-exprimierenden Zellen um rMSZ handelte.

Interessanterweise zeigten die baumartigen Fortsätze der NG2-positiven Oligodendrozyten, die sich aus den rMSZ entwickelt hatten, enge Kontakte zu β III Tubulin-positiven kortikalen Neuronen, so wie es auch bei kortikalen Oligodendrozyten beobachtet werden konnte (Braun et al., 2012).

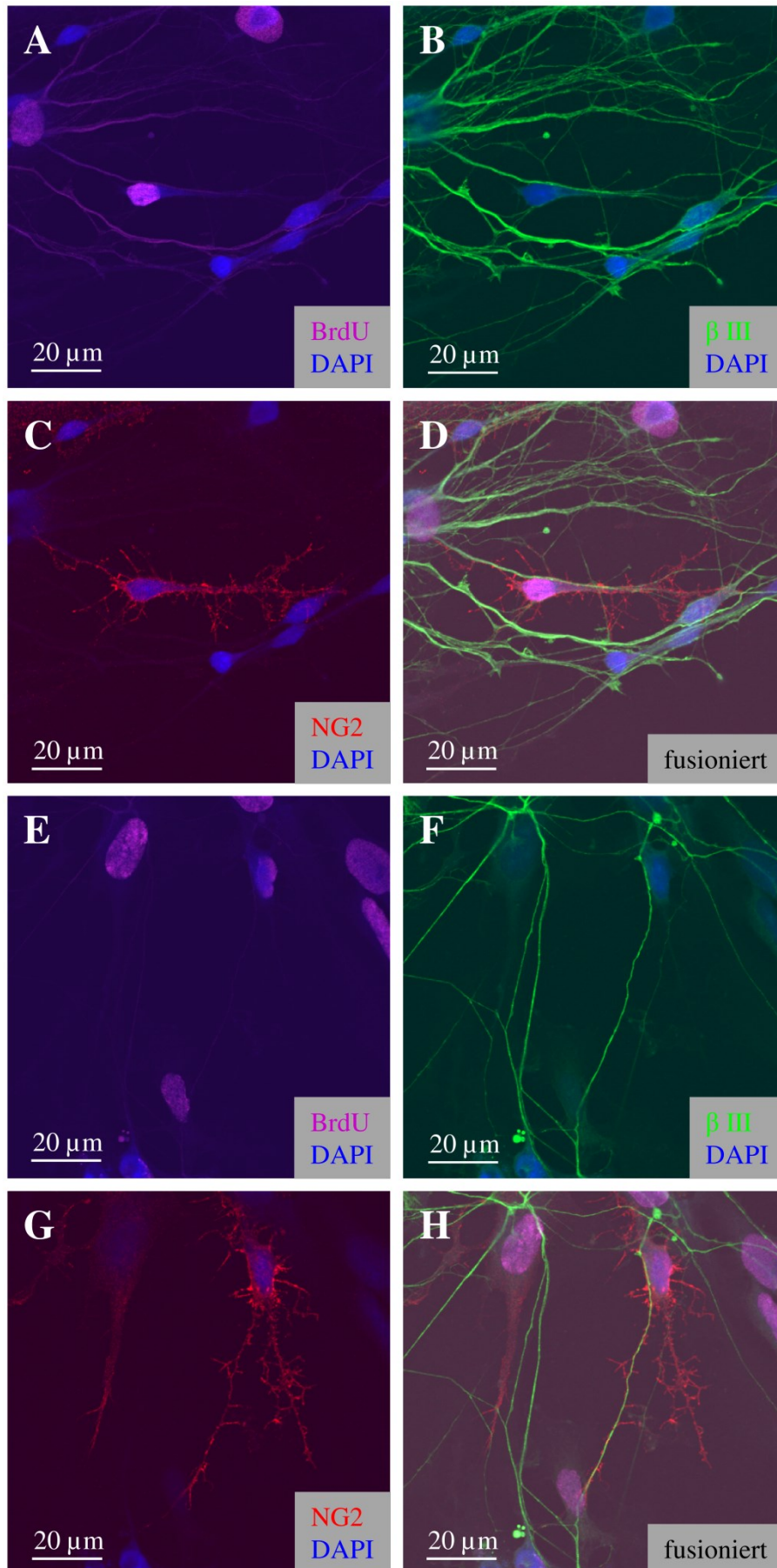


Abbildung 3.33: Kokultivierung von E18-PKZ und rMSZ.

Die rMSZ wurden vor der Kokultur 48 h mit BrdU kultiviert.

(A) BrdU-positive rMSZ in violett, DAPI-Kerne in blau.

(B) β III Tubulin-Expression in grün, DAPI-Kerne in blau.

(C) NG2-positive Zellen in rot, DAPI-Kerne in blau.

(D) Fusioniertes Bild aus (A) bis (C) Die NG2-positiven Zellen waren mit BrdU kolokalisiert.

Das bedeutet, dass es sich bei den NG2-exprimierenden Zellen um rMSZ handelte.

Außerdem lässt sich erkennen, dass sich die NG2-positiven Zellen wie Oligodendrozyten darstellten und Kontakte mit β III Tubulin-positiven Neuronen eingingen.

(E) bis (G) weiteres Beispiel für NG2-positive rMSZ, die Kontakt zu β III Tubulin-positiven Neuronen eingingen.

(Maßstab 20 μm)

3.16 Seltene spontane neuronale Differenzierung von rMSZ nach Sphäruleninduktion

Wie schon zuvor erwähnt, stellt die Fähigkeit unter nicht-adhärenenten Kulturbedingungen Neurosphärulen auszubilden, ein grundlegendes Charakteristikum neuronaler Stammzellen dar. Auch rMSZ waren in der Lage Neurosphärulen zu generieren (siehe Kapitel 3.3). Vergleichbar mit Sphärulen aus kortikalen Primärkulturen enthielten rMSZ-Sphärulen Zellen, die Nestin, β III Tubulin, NG2 und in geringem Maß GFAP exprimierten. Wurden die rMSZ-Sphärulen nach deren Induktion auf Deckgläschen ausgesät und unter den gleichen Bedingungen wie kortikale Primärkulturen weiter kultiviert, konnten seltene Differenzierungsphänomene beobachtet werden. Aus 1 bis 2 von insgesamt 50 untersuchten rMSZ-Sphärulen waren Zellen ausgewachsen, die doppelt positiv für β III Tubulin und DCX, zwei Marker für Neuronen, waren.

In Abbildung 3.35 sind rMSZ-Sphärulen dargestellt, die ein beginnendes Netzwerk von β III Tubulin-positiven Zellen zeigten, welche mit Nestin exprimierenden Stammzellen durchmischt waren. Auch dieses Ereignis war äußerst selten und war bei 1 bis 2 von 50 Sphärulen zu beobachten.

Diese spontane neuronale Differenzierung der rMSZ-Sphärulen unter adhärenenten Bedingungen wies eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu Sphärulen aus kortikalen Primärkulturen auf (Abbildung 3.36).

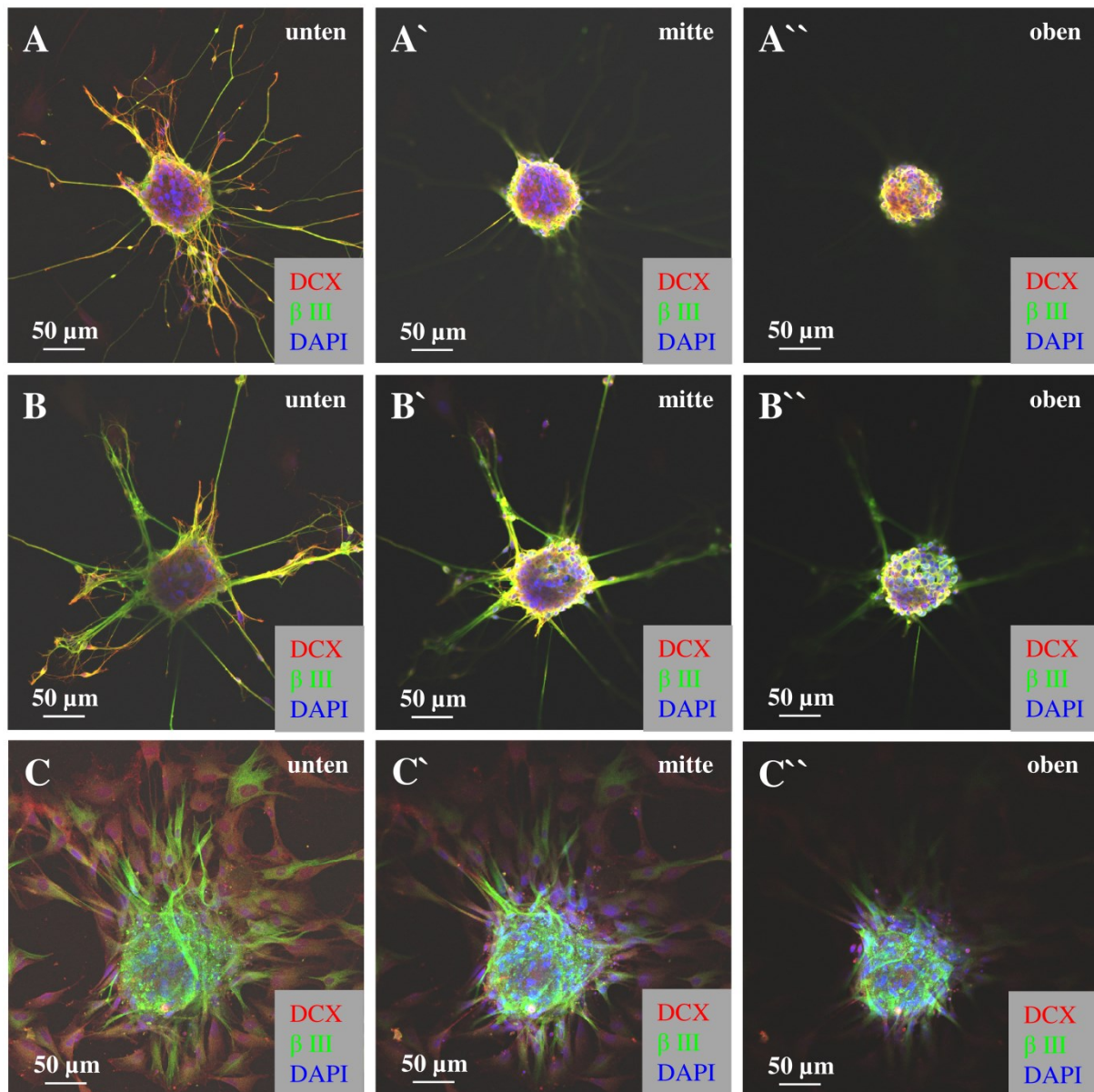


Abbildung 3.34: Ko-Expression von β III Tubulin und DCX in ausgesäten rMSZ-Sphärulen.

Die Induktion der Sphärulen erfolgte im Bioreaktor für 48 h mit rMSZ-Sphärulen-Standardmedium. Diese wurden dann 24 h bzw. 48 h auf Deckgläschen in Neurobasal-Medium weiterkultiviert. Es waren maximal 1 bis 2 Sphärulen unter 50 mit dieser neuronalen Differenzierung zu finden. Gezeigt sind optische Schnitte (sog. Z-Stacks) der rMSZ-Sphärulen in den Ebenen unten, mitte und oben.

(A) zeigt eine rMSZ-Sphärule, die nach 48-stündiger Induktion im Bioreaktor 24 h unter adhärennten Bedingungen weiterkultiviert wurde. In (B) ist eine rMSZ-Sphärule zu sehen, die 48 h adhärennt weiterkultiviert wurde. Die Kolokalisation von DCX (rot) und β III Tubulin (grün), die sich hauptsächlich auf die Randzone der Sphärulen konzentrierte, ist eindeutig zu erkennen (gelb). Als Vergleich ist in (C) eine Sphärule abgebildet, die kein DCX und nur wenig β III Tubulin exprimierte. Diese Sphärulen machten den Großteil aller Sphärulen auf demselben Deckgläschen aus. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 μ m)

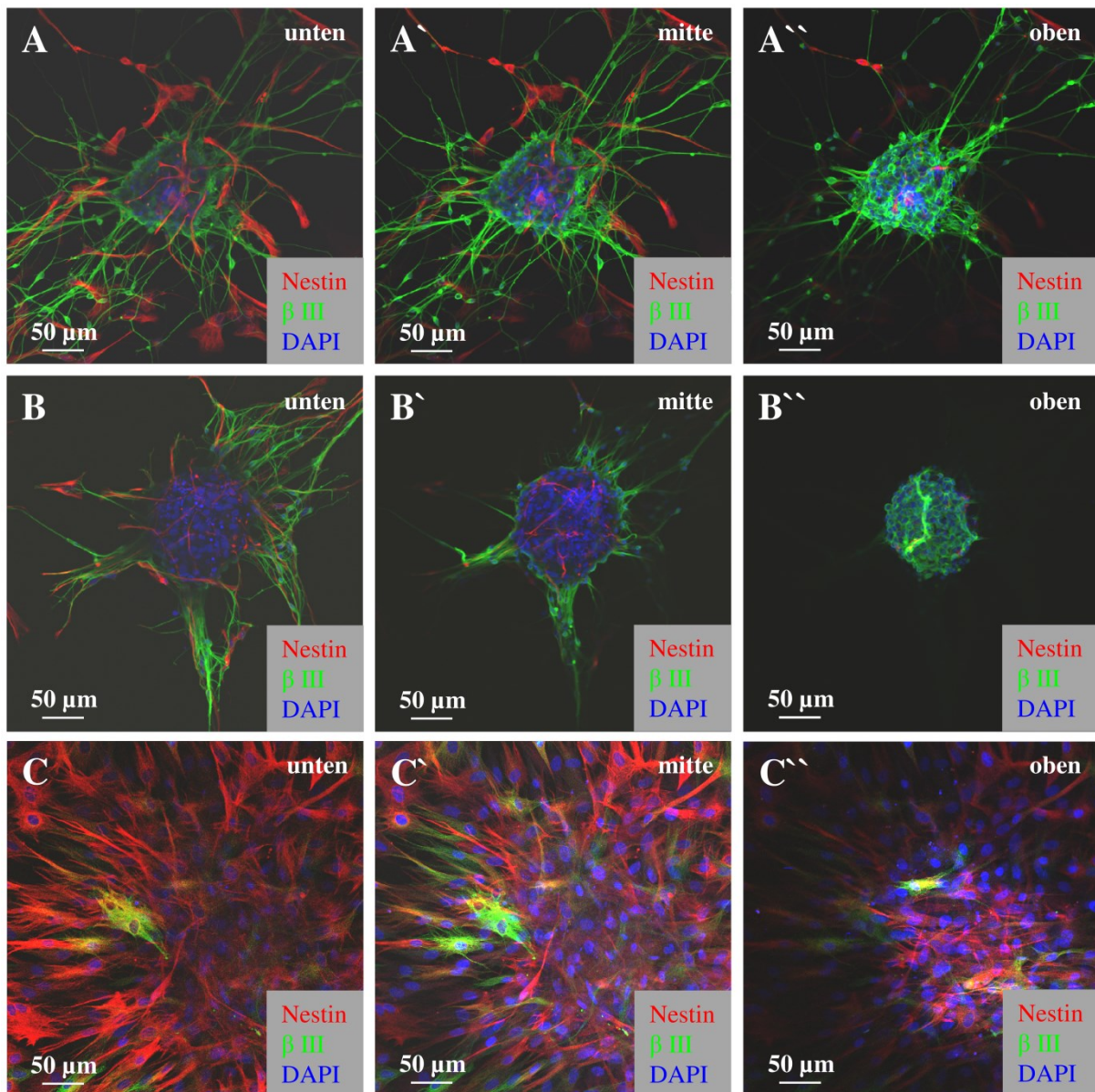


Abbildung 3.35: Expression von Nestin und β III Tubulin in ausgesäten rMSZ-Sphärulen.

Die Induktion erfolgte im Bioreaktor für 48 h mit rMSZ-Sphärulen-Standardmedium und danach wurde für 24 h bzw. 48 h auf Deckgläschen in Neurobasal-Medium weiterkultiviert. Es waren maximal 1 bis 2 Sphärulen von 50 mit dieser neuronalen Differenzierung zu finden. Gezeigt sind optische Schnitte (sog. Z-Stacks) der rMSZ-Sphärulen in den Ebenen unten, mitte und oben.

(A) und (B) zeigen jeweils eine rMSZ-Sphärule die sowohl Nestin (rot) als auch β III Tubulin (grün) exprimierte. Eine Ko-Expression konnte nicht detektiert werden. Der Großteil der Sphärulen wies jedoch ein Expressionsmuster wie in (C) auf. Auch hier konnten Nestin und β III Tubulin detektiert werden, allerdings hatten diese Sphärulen eine bedeutend flächigere Struktur. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 μ m)

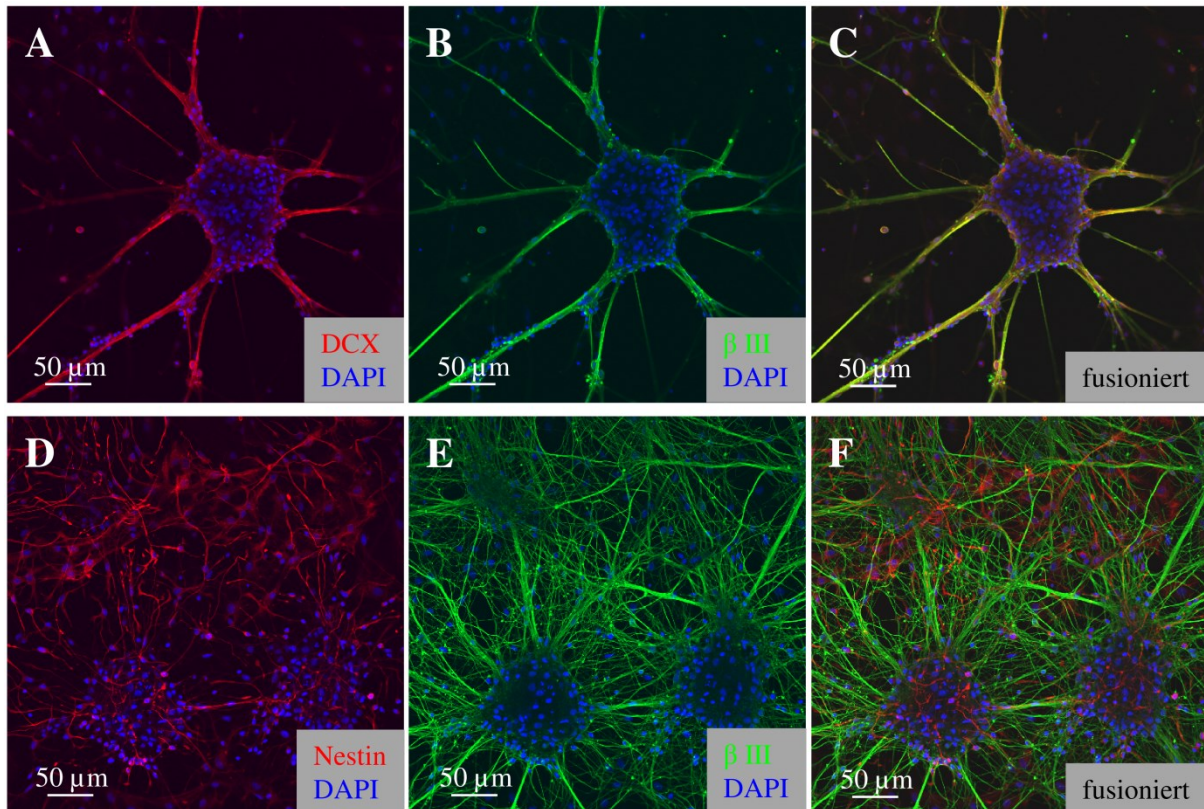


Abbildung 3.36: Auswachsene Neurosphärulen einer kortikalen Primärkultur.

(A) bis (C) Aus den Sphärulen migrierten junge Neurone, die gleichzeitig DCX (rot) und β III Tubulin (grün) exprimierten. (D) bis (F) Netzwerk von β III Tubulin-positiven Zellen (grün) durchsetzt mit Nestin-exprimierenden Zellen (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. (Maßstab 50 μ m)

3.17 Einfluss verschiedener Medien auf die Expression ausgewählter Proteine auf Genebene

Die quantitative Analyse der Expressionsprofile auf Genebene erfolgte mittels quantitativer *real time* PCR in einem LightCycler® mit Kapillartechnik. Es wurden folgende Gene untersucht: β III Tubulin, NG2, Nestin, S100 β , c-Myc, Rex1, CXCR4 und SDF1. Als Referenzgen wurde das konstitutiv exprimierte Gen G6PDH (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet.

Untersucht werden sollte der Einfluss verschiedener Kultivierungsbedingungen auf adhärent wachsende rMSZ. Konkret ging es dabei um die Wirkung der neurogenen Differenzierungsmedien NDM CET und NDM PC sowie um die Wirkung eines Serumentzuges auf die Expression der oben genannten Markerproteine.

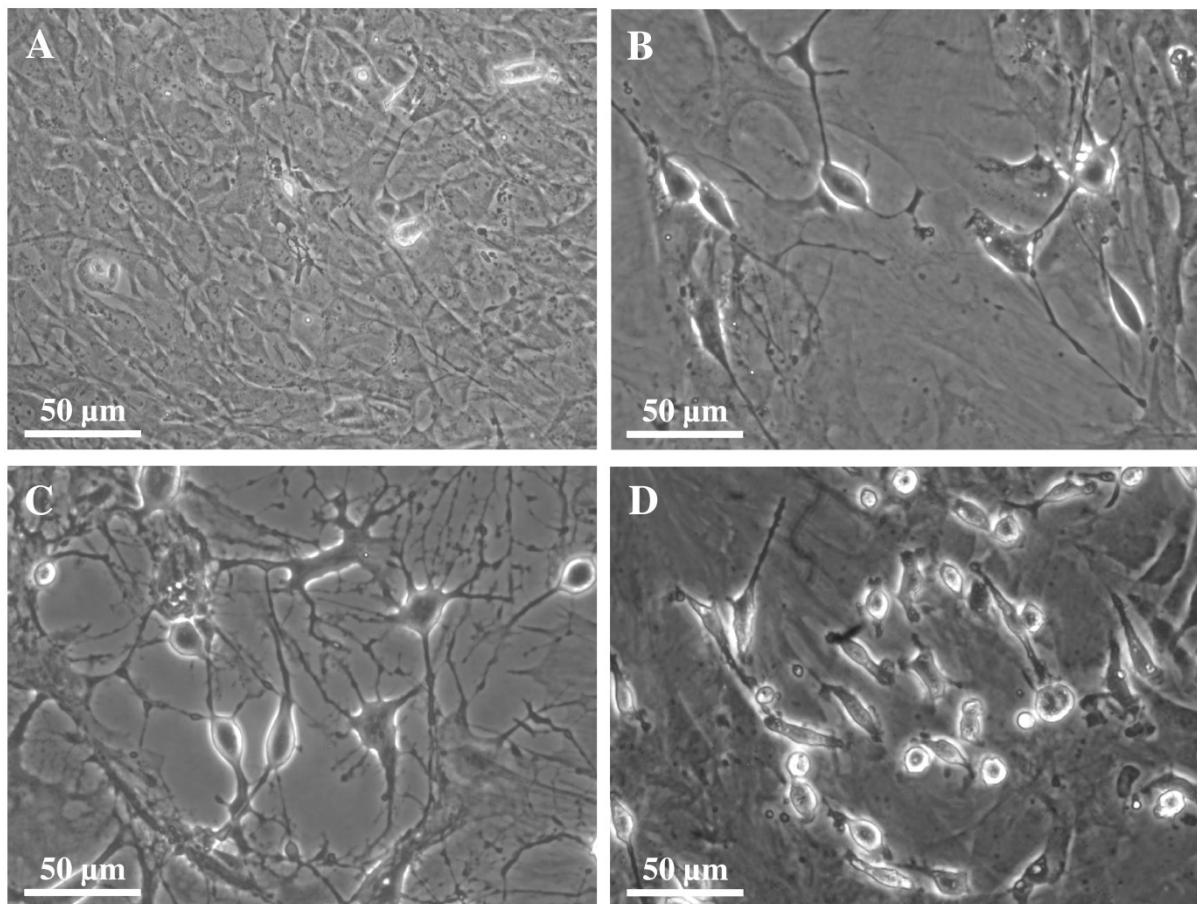


Abbildung 3.37: rMSZ unter verschiedenen Kulturbedingungen.

(A) Konfluente Zellrasen von rMSZ unter basalen Kulturbedingungen. (B) rMSZ 4 h nach Zugabe von NDM CET. (C) rMSZ 2 h nach Zugabe von NDM PC. (D) rMSZ nach 3-tägiger Kultivierung im serumfreien Alpha-Medium. Der komplette Serumentzug führte zur Bildung von kleinen runden bzw. bipolaren rMSZ, die sich auf dem konfluenten Zellrasen befanden. (Maßstab 50 μ m)

Die drastischste Veränderung im Expressionsprofil zog der Serumentzug nach sich. In den SD-rMSZ kam es zu einem merklichen Anstieg des Stammzellmarkers Nestin und dem glialen Marker S100 β , der primär in Astrozyten exprimiert wird. Zusätzlich nahm die Expression von β III Tubulin (Marker für junge, unreife Neurone) zu. Ebenfalls signifikant erhöht war Rex1. Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der für die Regulation von Differenzierungsprozessen verantwortlich ist und auch in ES-Zellen exprimiert wird. Der Transkriptionsfaktor c-Myc, der zur Langzeiterhaltung des ES-Zell-Phänotyps als auch zur schnellen Proliferation von ES-Zellen in Kultur beiträgt, war genau wie Rex1 erhöht. Von besonderer Bedeutung war auch der gleichzeitige Anstieg des Chemokins SDF1 und seines Rezeptors CXCR4. Beide Gene spielen eine große Rolle bei der Mobilisierung und gerichteten Migration von Stammzellen. Lediglich NG2, ein Marker für junge Oligodendrozyten, wurde durch den Serumentzug im Vergleich zu basalen rMSZ reduziert.

Im Gegensatz zum Serumentzug waren die beiden kommerziellen neurogenen Differenzierungsmedien weniger wirkungsvoll in Hinblick auf die Expression der untersuchten Markerproteine.

rMSZ, die für 4 h mit NDM CET behandelt wurden, zeigten einen signifikanten Anstieg für die Marker S100 β , c-Myc, CXCR4 und SDF1 im Gegensatz zu basalen rMSZ. Die Marker β III Tubulin und NG2 wurden dagegen reduziert. Das auf morphologischer Ebene schneller wirkende NDM PC führte wie auch der Serumentzug zu einem signifikanten Anstieg von Nestin und Rex1. Merklich reduziert wurden die Markerproteine c-Myc und SDF1.

Im Vergleich zu NDM CET und dem Serumentzug bewirkte NDM PC als einziges Medium eine signifikante Erhöhung in der Expression des Oligodendrozytenmarkers NG2. Dieser Effekt wurde auch durch die immunzytochemischen Untersuchungen (siehe Abbildung 3.16 B) belegt.

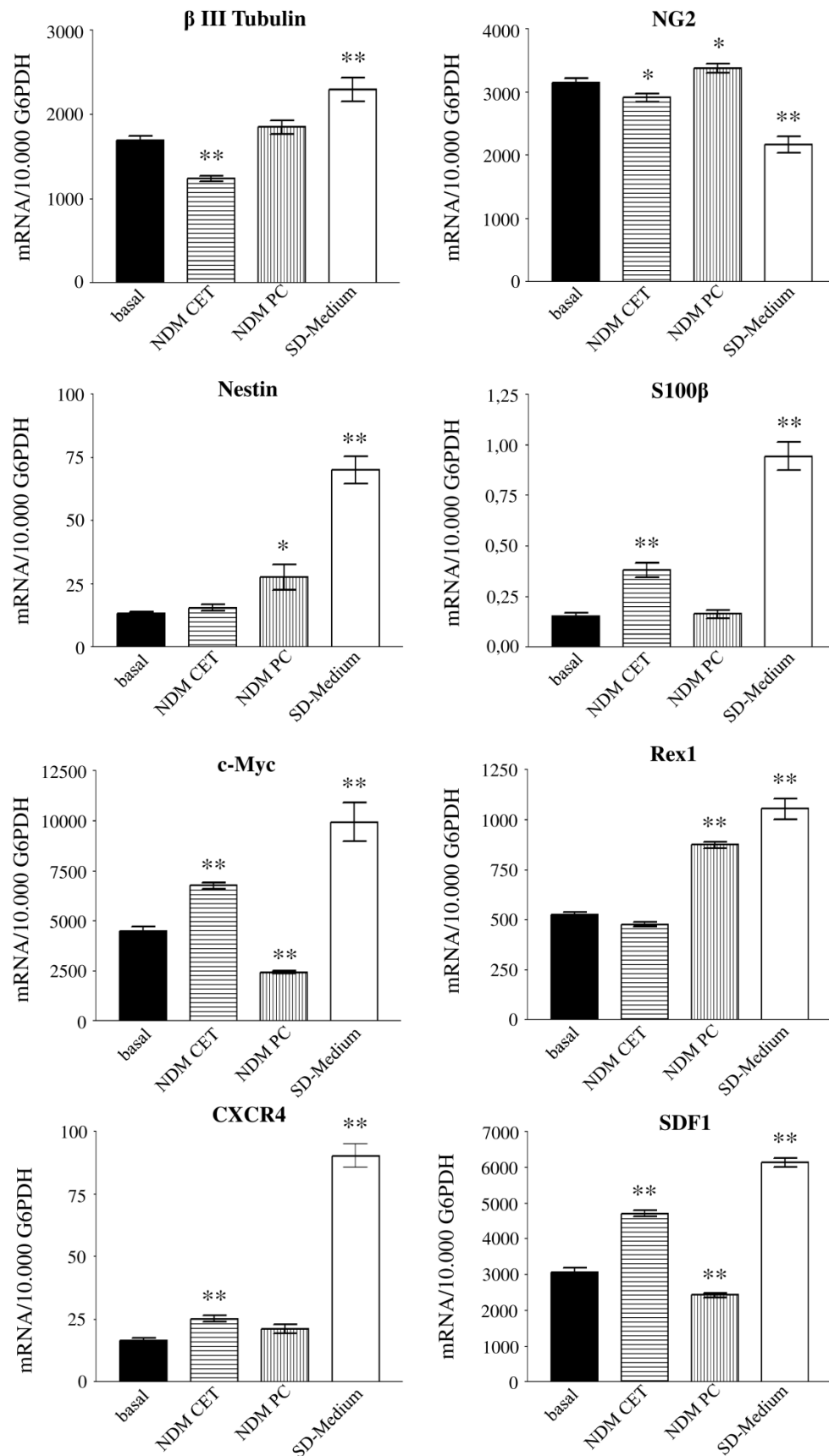


Abbildung 3.38: Quantitative RT-PCR mittels LightCycler PCR.

Gezeigt wird die Expression ausgesuchter Markergene in Relation zu G6PDH, einem konstitutiv exprimierten Gen.

4 DISKUSSION

Das Knochenmark enthält sämtliche blutbildenden Stammzellen und repräsentiert somit die wichtigste Ressource für eine lebenslang andauernde Regeneration von Blut und wahrscheinlich auch von dessen Gefäßen. Neben den hämatopoetischen Stammzellen enthält das Knochenmark mesenchymale Stammzellen. Sie gelten als Vorläufer mesenchymaler Zellen und lassen sich durch ihre Adhärenz auf Plastikoberflächen in Zellkulturschalen züchten. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass sowohl das Knochenmark als auch bereits kultivierte mesenchymale Stammzellen Subpopulationen von Stammzellen enthalten, die Eigenschaften von pluripotenten embryonalen Stammzellen aufweisen (Kucia et al., 2006; Sauerzweig et al., 2009a). Nach wie vor umstritten ist die Frage, inwieweit diese speziellen Subpopulationen von Knochenmarkstammzellen auch in der Lage sind, in neurale Zellen zu differenzieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, herauszufinden, unter welchen *in vitro* Wachstumsbedingungen Subpopulationen aus Knochenmarkstammzellen der Ratte (rMSZ) angereichert werden können und ob diese Zellen auch Eigenschaften neuraler Zellen aufweisen. Für diese Aufgabe standen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: (I) der Einsatz spezieller Medien, (II) die Induktion von Neurosphärulen-ähnlichen Strukturen und (III) die Ko-Kultivierung der rMSZ mit kortikalen Primärkulturzellen. Als positives Vergleichsmodell für die Expression neuraler Marker wurden neurale Primärkulturzellen aus dem Kortex embryonaler Ratten verwendet. Die kortikale Primärkultur ist eine virtuelle 3D-Struktur, die sich aus Astrozyten, Neuronen, Oligodendrozyten, neuralen Stammzellen und Mikroglia zusammensetzt (Braun et al., 2006). Mikrogliazellen sind keine Abkömmlinge des Neuroektoderms, sondern wie die MSZ eingewanderte Zellen aus dem Knochenmark und somit mesodermalen Ursprungs (Boya et al., 1979; Kettenmann et al., 2011). Die in der Primärkultur enthaltenen Zellen besitzen die Fähigkeit Neurosphärulen auszubilden (Braun et al., 2006).

Vorarbeiten von Sauerzweig et al. belegen, dass MSZ eine äußerst heterogene Zellpopulation darstellen. Durch einen kompletten Serumentzug konnte eine Subpopulation von Stammzellen, die SD-KMSZ, identifiziert und auch angereichert werden (Sauerzweig et al., 2009a). Diese SD-KMSZ exprimierten Marker embryonaler und neuraler Stammzellen. Auch in anderen *in vitro* Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass humane, murine und Ratten-MSZ mittels entsprechender Kultivierungsbedingungen nicht nur in Zellen des

mesodermalen Phänotyps (Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten) sondern auch in neurale Zellen differenzieren können (Woodbury et al., 2000; Sanchez-Ramos et al., 2000).

Die für diese Arbeit verwendeten mesenchymalen Stammzellen aus der Ratte wurden aus dem Knochenmark isoliert. Die humanen mesenchymalen Stammzellen wurden von der Firma Millipore bezogen. Mittels immunzytochemischer Färbungen und Videomikroskopie konnten die Differenzierungsvorgänge der MSZ sichtbar gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass kommerziell erhältliche neurogene Differenzierungsmedien in der Lage sind, MSZ in Zellen mit neuronaler und Oligodendrozyten-ähnlicher Morphologie zu differenzieren.

4.1 Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen aus der Ratte

Wie bereits erwähnt, wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten MSZ nach einem von Sauerzweig et al. etablierten Protokoll aus dem Knochenmark juveniler Sprague-Dawley-Ratten in mehreren unabhängigen Präparationen isoliert (Sauerzweig et al., 2009a). Pro Präparation wurden 25 Ratten verwendet, um sicherzugehen, dass die Zellausbeute bezüglich Qualität und Quantität keine Individuen-spezifischen Unterschiede aufwies.

Bis heute ist kein spezifisches Oberflächenmolekül bekannt, welches die mesenchymalen Stammzellen eindeutig charakterisiert (Jones und McGonagle, 2008; Morikawa et al., 2009). Es wurden Zytokinrezeptoren, Rezeptoren anderer Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrixrezeptoren auf den MSZ gefunden, die für eine unverwechselbare Identifizierung jedoch nicht ausreichend sind. MSZ unterscheiden sich allerdings von hämatopoetischen Zellen dadurch, dass sie kein CD34 und CD45 exprimieren (Pittenger et al., 1999). Aus diesem Grund ist es bisher auch noch nicht gelungen, mesenchymale Stammzellen *in situ*, also innerhalb des Knochenmarks, zu detektieren (Bianco, 2011). Die Angaben zum Markerprofil sind wahrscheinlich deshalb so schwierig, weil es sich bei den MSZ unter *in vitro* Bedingungen um eine sehr inhomogene Zellpopulation handelt. Das einzige Kriterium für ihre Isolierung ist immer noch das von Friedenstein und Kollegen 1970 entdeckte Adhären auf der Kunststoffoberfläche von Zellkulturschalen (Friedenstein et al., 1970). Durch einen Wechsel des Mediums drei Tage nach der Aussaat des dissoziierten Knochenmarks wurden nicht-adhären Zellen und Zelltrümmer aus der Kultur entfernt. Übrig blieben die isolierten MSZ, die bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert wurden. Wie seit langer Zeit aus der Literatur bekannt, zeigten die rMSZ unter basalen Kulturbedingungen die

zwei typischen Morphologien: langgestreckte Fibroblasten-ähnliche Zellen und große abgeflachte Zellen (Mets und Verdonk, 1981).

Mittels immunzytochemischer Färbungen wurde die Basalkultur der rMSZ auf die Expression verschiedener neuroektodermaler Marker hin untersucht. Die rMSZ exprimierten weder GFAP (astroglialer Marker) noch Nestin, β III Tubulin oder DCX (neurale Markerproteine). Es konnte lediglich eine schwache NG2-Expression nachgewiesen werden. NG2 ist ein oligodendroglialer Marker. Jedoch zeigten diese NG2-positiven Zellen keine für Oligodendrozyten charakteristische Morphologie wie man sie aus kortikalen Primärkulturen her kennt (Braun et al., 2006).

4.2 Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Die hMSZ wurden als tiefgefrorene Aliquots mit je 1 Million Zellen von der Firma Millipore käuflich erworben. Die Kultivierung erfolgte streng nach Herstellerangaben. Wie die rMSZ wiesen die hMSZ die in der Literatur beschriebenen typischen Morphologien auf: schmale spindelförmige Zellen und große flächige Zellen (Docheva et al., 2008; Haasters et al., 2009).

Beim Vergleich beider Zellpopulationen konnten gravierende Unterschiede zwischen den MSZ der Ratte und denen humanen Ursprungs festgestellt werden. Betrachtete man die gesamte Kultur und nicht nur einzelne Zellen, so war eindeutig ersichtlich, dass die MSZ der Ratte eine ungeordnete Wachstumsrichtung aufwiesen, während sich die humanen MSZ durch eine überwiegend parallele Wachstumsausrichtung auszeichneten (Motaln et al., 2010) (Abbildung 4.1). Ebenfalls auffällig waren die Wachstumsgeschwindigkeiten der beiden Zellpopulationen. Während die rMSZ nach 6 Tagen in Kultur eine Konfluenz von 80 bis 90 % zeigten, erreichten die hMSZ erst nach 10 Tagen eine vergleichbare Konfluenz. Außerdem waren Unterschiede in der Expression neuroektodermaler Marker deutlich erkennbar. Im Gegensatz zu den rMSZ waren die hMSZ sowohl Nestin-positiv als auch β III Tubulin-positiv. Die Nestin-positiven hMSZ besaßen eine äußerst schmale und langgestreckte Struktur. Die β III Tubulin-positiven Zellen wiesen dagegen eine große abgeflachte Morphologie auf, die sich deutlich von der typischen Struktur β III Tubulin-exprimierender Zellen (z. B. Neurone einer kortikalen Primärkultur) unterschied. Des Weiteren exprimierten einige hMSZ den oligodendroglialen Marker NG2. Doch auch diese Zellen zeigten nicht die für Oligodendrozyten typische baumartige Morphologie. Das beschriebene Expressionsmuster ist mit dem vergleichbar, was von Park und Kollegen beobachtet wurde. Sie verwendeten hMSZ aus der Nabelschnur. Unter Basalbedingungen exprimierten die Zellen Nestin, β III Tubulin, GFAP und O4 (Oligodendrozyten-Marker). Weder die β III Tubulin-positiven,

noch die O4-positiven hMSZ zeigten jedoch Morphologien von typischen Neuronen oder Oligodendrozyten. Im Gegensatz zu den hMSZ aus der Nabelschnur exprimierten die in der vorliegenden Arbeit verwendeten hMSZ kein GFAP. Ein weiterer Unterschied besteht im Erscheinungsbild der Nestin-exprimierenden Zellen. Die Nabelschnur-hMSZ wiesen eine großflächige Morphologie auf (Park et al., 2011). Die hier verwendeten hMSZ, die Nestin-positiv waren, besaßen dagegen eine schmale lang gestreckte Morphologie. Möglicher Grund für die Unterschiede könnten die verschiedenen Quellen der humanen MSZ sein, was darauf schließen lässt, dass es sich um verschiedene Subpopulationen handelt.

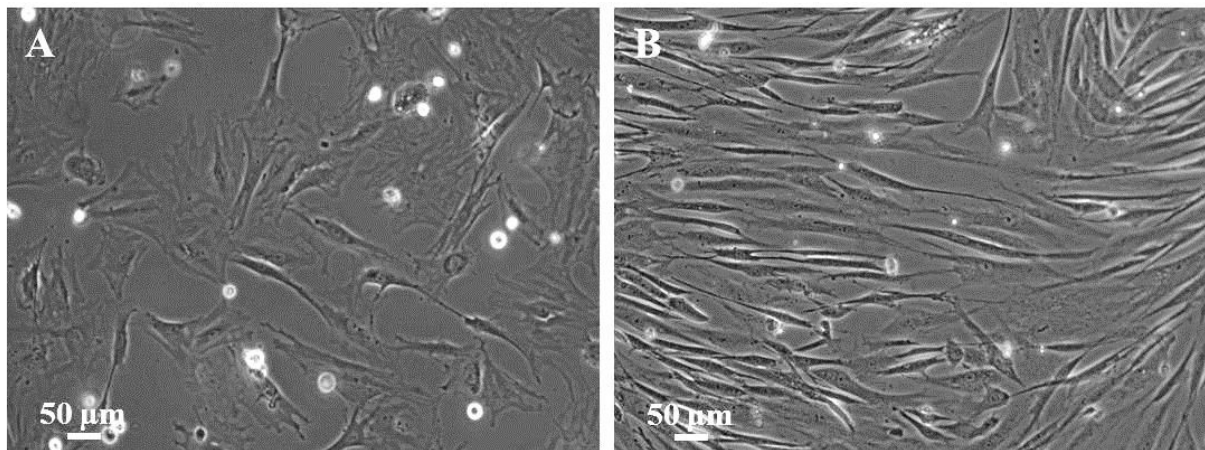


Abbildung 4.1: Vergleich von MSZ aus der Ratte mit humanen MSZ.

(A) Mesenchymale Stammzellen aus der Ratte zeigten eine ungeordnete Wachstumsrichtung, (B) während humane Zellen eine geordnete, annähernd parallele Wachstumsausrichtung aufwiesen. (Maßstab 50 µm)

4.3 Neurosphärulen-Induktion aus Knochenmarkstammzellen

Seit nun mehr 20 Jahren wird die Induktion von Neurosphärulen mit dem sogenannten Neurosphärulenprotokoll als Nachweis für neurale Stammzellen (NSZ) anerkannt. Die beiden Wissenschaftler Reynolds und Weiss entdeckten 1992 neurale Stammzellen, indem sie murine striatale Zellen in serumfreiem Medium zusammen mit den Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2 kultivierten. Nur wenige Zellen, die NSZ, überlebten und bildeten proliferierende frei schwimmende Zellaggregate (Sphärulen). Diese Sphärulen exprimierten den neuroepithelialen Stammzellmarker Nestin (Reynolds und Weiss, 1992). Hauptsächlich wird das Neurosphärulenkultursystem verwendet, um die Existenz von Stammzellen in verschiedenen Regionen des ZNS in bestimmten Entwicklungsstadien nachzuweisen (Weiss et al., 1996; Gritti et al., 1999; Hitoshi et al., 2002; Lu und Wong, 2005; Yang und Levison, 2006). Es ist aber auch möglich aus nicht aus dem Hirn stammenden Zellen Neurosphärulen zu induzieren. Diverse Studien belegen, dass sowohl humane Knochenmarkstammzellen als auch MSZ aus der Ratte zur Sphäruleninduktion fähig sind und morphologisch gleich

aussehende Zellaggregate bilden wie die NSZ (Lee et al., 2003; Kim et al., 2006; Fu et al., 2008; Yang et al., 2008).

Die in dieser Arbeit aus den mesenchymalen Stammzellen generierten Neurosphärulen entstanden nach einem leicht abgewandelten Protokoll von Sauerzweig. Während Sauerzweig 10 % FKS verwendete und die Zellen in Bakterialschalen mit geringer adhäsiver Oberfläche aussäte, wurden in der vorliegenden Arbeit 20 % FKS zum Medium dazugegeben und die MSZ in Bioreaktoren inkubiert (Sauerzweig et al., 2009a). Diese Bioreaktoren zeichnen sich durch ihre nicht-adhäsive Innenbeschichtung aus, was ein Adhärenz der Zellen verhindert. Neurosphärulen-ähnliche Strukturen ließen sich sowohl aus rMSZ als auch aus hMSZ erfolgreich induzieren. Das deutete daraufhin, dass in den basalen MSZ-Kulturen Zellen enthalten waren, die neurale Stammzeleigenschaften aufwiesen. Zu Vergleichszwecken wurden kortikale Primärkulturzellen herangezogen, die bekanntermaßen NSZ enthalten (Braun et al., 2006). Die induzierten Neurosphärulen aller drei Zellpopulationen zeigten die aus der Literatur bekannte Neurosphärulen-ähnliche Struktur (Wislet-Gendebien et al., 2003; Hermann et al., 2004; Suzuki et al., 2004). Allerdings erschienen die Sphärulen der Primärkultur kompakter als die der rMSZ und hMSZ. Die rMSZ-Sphärulen waren ähnlich wie die Sphärulen aus kortikalen Primärkulturen immunreaktiv für Nestin, β III Tubulin und NG2 (Braun et al., 2006), im Gegensatz dazu aber negativ für GFAP. Die hMSZ-Sphärulen exprimierten dagegen nur β III Tubulin und NG2, jedoch kein Nestin.

Die Ergebnisse für rMSZ-Sphärulen entsprechen denen von Hermann und Kollegen, die ebenfalls keine GFAP-positiven Zellen nachweisen konnten. Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Sphärulen wurden die humanen Zellen bei Hermann jedoch ohne Serum kultiviert. Die in dieser Arbeit generierten humanen MSZ-Sphärulen waren ebenfalls negativ für GFAP, was wiederum mit den Sphärulen von Hermann übereinstimmt. Es konnte jedoch im Vergleich zu Hermann keine Nestinexpression detektiert werden (Hermann et al., 2004). Die beobachteten Unterschiede zeigen, wie sensitiv das Neurosphärulenkultursystem ist. Kleinste Variationen in Bestandteilen und Konzentrationen von Wachstumsfaktoren im Medium, die Methode oder Frequenz der Passagierung der Zellen, die Kultivierung mit und ohne Serum sind nur einige Beispiele, mit denen die Differenzen erklärt werden können (Jensen und Parmar, 2006).

4.4 Auswirkungen der neurogenen Differenzierungsmedien unter adhärennten Kulturbedingungen

Die rMSZ und die hMSZ sollten im Rahmen dieser Arbeit auf ihr Differenzierungspotential hin untersucht werden. Dazu wurden die neurogenen Differenzierungsmedien der Firma *Promocell* (NDM PC) und der Firma *Cellular Engineering Technology* (NDM CET) eingesetzt. Da es sich bei beiden Medien um kommerziell erhältliche Medien handelt, kann keine Aussage über deren Inhaltsstoffe gemacht werden. Im Gegensatz zu NDM PC musste das NDM CET laut Herstellerangaben mit 10 % FKS versehen werden.

Wie vom Hersteller beschrieben, konnten nach nur wenigen Stunden sowohl bei den rMSZ als auch bei den hMSZ Neuronen-ähnliche Zellen beobachtet werden. Am auffälligsten war dieser Differenzierungseffekt mit dem NDM PC. Nach nur 4-stündiger Inkubation in diesem Medium differenzierten die rMSZ und auch die hMSZ in kleine rundliche Zellen, die Neuronen-artige Ausläufer bildeten. Diese kleinen runden Zellen hatten große Ähnlichkeiten mit den von Sauerzweig entdeckten SD-KMSZ bzw. mit den VSEL-Zellen von Kucia (Sauerzweig et al., 2009a; Kucia et al., 2006). Die SD-KMSZ entstanden aus mesenchymalen Knochenmarkstammzellen der Ratte, die 3 Tage ohne Serum kultiviert wurden. Kucia und Kollegen entdeckten im murinem Knochenmark die VSEL-Zellen als eine Subpopulation sehr kleiner ES-Zell-ähnlicher Stammzellen (*very small embryonic like stem cells*, VSEL-Zellen). Im Gegensatz zu den rMSZ fanden sich in den hMSZ-Kulturen, die mit NDM PC inkubiert wurden, zusätzlich zu den Neuronen-ähnlichen Zellen auch Zellen mit einer auffälligen baumartigen Morphologie. Bei beiden Zellarten handelte es sich jedoch um eine vorübergehende Differenzierung. Nach spätestens 48 Stunden waren fast alle Zellen wieder in ihr für mesenchymale Stammzellen typisches Erscheinungsbild zurückgekehrt.

Die neuronale Differenzierung der MSZ wurde mithilfe der Immunzytochemie und Videomikroskopie genauer untersucht. Die immunzytochemischen Färbungen ergaben, dass bereits eine 2-stündige Inkubation der rMSZ ausreichte, um eine erhöhte Expression von β III Tubulin und überraschenderweise auch von NG2, einem oligodendroglialen Marker, zu detektieren. Die NG2-positiven Zellen zeigten auch die für Oligodendrozyten typische baumartige Morphologie, die aus den zu Vergleichszwecken präparierten Primärkulturen bekannt war. Das Medium von *Promocell* schien einen noch größeren Effekt auf die Morphologie der rMSZ zu haben. Die immunzytochemischen Färbungen, die von den 2-stündig behandelten Kulturen angefertigt wurden, belegten deutlich eine erhöhte Expression von β III Tubulin und auch NG2. Es konnten β III Tubulin-positive Zellen beobachtet werden, die genau wie Neurone einer Primärkultur lange dünne Ausläufer bildeten und so mit anderen

Zellen in Kontakt traten. Auch die NG2-positiven Zellen waren nicht von Oligodendrozyten einer Primärkultur zu unterscheiden. Nach nur 7 Stunden konnten zwar immer noch Zellen mit erhöhter β III Tubulin- bzw. NG2-Expression nachgewiesen werden, jedoch ohne die für Neuronen- bzw. Oligodendrozyten-typische Morphologie. Es handelte sich also eindeutig um eine transiente Differenzierung.

Nachdem auch die hMSZ nach Behandlung mit den NDM morphologische Veränderungen aufwiesen, wurden sie ebenfalls immunzytochemisch untersucht. Wie bei den rMSZ wurden β III Tubulin- und NG2-exprimierende Zellen gefunden. Außerdem konnte sowohl in mit NDM CET als auch in mit NDM PC behandelten Kulturen eine erhöhte Expression von Nestin detektiert werden, einem Marker für neurale Stammzellen. Im Gegensatz zu den rMSZ-Kulturen benötigten die humanen MSZ jedoch mehr Zeit für die beobachteten Differenzierungseffekte. Auch bei den hMSZ konnte NDM PC NG2-positive Zellen induzieren, deren Morphologie nicht von den Oligodendrozyten einer kortikalen Primärkultur zu unterscheiden war. Im Gegensatz dazu zeigten jedoch die β III Tubulin-positiven Zellen keine neuronale Morphologie (siehe Abbildung 3.18). Trotz alledem handelte es sich auch hier um ein vorübergehendes Phänomen.

Durch den Einsatz der Videomikroskopie war es möglich, die durch die NDM induzierten Vorgänge auf Einzelzellebene zu erforschen. Zunächst erfolgten Videoaufnahmen von rMSZ und hMSZ unter basalen Kulturbedingungen. Anhand dieser Aufnahmen stellte sich heraus, dass es sich bei den rMSZ um äußerst motile Zellen handelte. Sie bewegten sich über die Zellkulturoberfläche und vermehrten sich kontinuierlich. Auch die hMSZ waren in der Lage sich über die Oberfläche zu bewegen. Sie bildeten einen lang gestreckten Ausläufer, der sich wie ein Anker an einer anderen Stelle der Oberfläche festhielt, und zogen dann den Zellkörper nach. Anders als bei den rMSZ fanden nur wenige Zellteilungen statt, was wiederum ein Beleg für die schon zuvor beschriebenen Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit war.

Darauf folgend wurden die Effekte der NDM untersucht. In den Videoaufnahmen war deutlich zu erkennen, dass es durch NDM CET und NDM PC sowohl bei den rMSZ als auch bei den hMSZ zu merklichen morphologischen Veränderungen kam. Die Zellen zogen sich zusammen und bildeten kleine runde Zellkörper, aus denen Neuronen-artige Ausläufer auswuchsen. Dies geschah aber nicht mit allen Zellen. Diverse Zellen behielten ihre ursprüngliche Morphologie bei oder differenzierten nur kurzzeitig, während andere Zellen über mehrere Stunden die Neuronen-ähnliche Gestalt annahmen. Ein Grund dafür könnte sein,

dass es sich bei den MSZ um eine überaus heterogene Zellpopulation handelt und somit nur bestimmte Zellen, die Voraussetzungen für eine Differenzierung erfüllen.

Die neurogenen Differenzierungsmedien sind neben der Sphäruleninduktion ein weiteres Beispiel, wie durch veränderte Wachstumsbedingungen eine schnelle dafür aber nicht dauerhafte genetische Umprogrammierung induziert werden kann. Dass es zu einer genetischen Umprogrammierung kommt, wird aus den qRT-PCR-Daten ersichtlich. In einer vergleichenden Untersuchung wurden rMSZ unter Basalbedingungen, nach Inkubation mit NDM CET und NDM PC und nach Serumentzug auf die Expression ausgewählter Gene analysiert. Die serumdeprivierten MSZ zeigten dabei die drastischsten Veränderungen. Wie schon von Sauerzweig herausgefunden, exprimierten die SD-MSZ auf mRNS-Ebene vermehrt Nestin, S100 β und c-Myc. Darüber hinaus wurden die Zellen in der vorliegenden Studie auf folgende Gene hin untersucht: β III Tubulin, NG2, Rex1, CXCR4 und SDF1. Abgesehen von NG2 wurden alle anderen Gene in den serumdeprivierten MSZ im Vergleich zu basalen MSZ verstärkt exprimiert. NDM CET führte bei den rMSZ zu signifikant erhöhten Expressionen von S100 β , c-Myc, CXCR4 und SDF1. Dagegen hatte sich die Expression von β III Tubulin und NG2 signifikant verringert. Dieser Befund steht allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen der immunzytochemischen Färbungen, die eindeutig das Vorhandensein von sowohl β III Tubulin- als auch NG2-positiven Zellen bewiesen. Die Unterschiede in der Expression auf Proteinebene und auf mRNS-Ebene können damit erklärt werden, dass die jeweiligen Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfanden. In weiterführenden Experimenten sollten verschiedene Zeitpunkte ausgewählt werden, um die Änderungen in der Genexpression zeitabhängig zu analysieren. Kein Unterschied wurde für die Expression von Nestin und Rex1 festgestellt.

Für rMSZ, die mit NDM PC inkubiert wurden, ließ sich folgendes Markerprofil ableiten: Die Zellen exprimierten signifikant vermehrt NG2, Nestin und Rex1. c-Myc und SDF1 wurden jedoch im Vergleich zur Basalkultur signifikant weniger exprimiert. Für β III Tubulin, S100 β und CXCR4 konnten keine Unterschiede in der Expressionsrate ermittelt werden.

SDF1 (engl. *stromal cell-derived factor 1*) ist ein chemotaktisch wirkendes, also die Zellbewegung steuerndes Zytokin. Es spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Mobilisierung und zielgerichteten Wanderung von Stammzellen in die jeweiligen Speicherorgane, in ihre Verwendungsorte bei der Organogenese und der Organ- und Wundheilung (Imitola et al., 2004; Lapidot et al., 2005; Wen et al., 2012). Die von SDF1 beschriebenen Effekte werden durch eine Bindung und Aktivierung des an der Zelloberfläche exprimierten Rezeptors CXCR4 vermittelt. Diverse Studien haben gezeigt, dass SDF1 unter anderem entlang des

ischämischen Randgebietes (Penumbra) im Gehirn exprimiert wird und somit die Migration transplanteder Zellen in die ischämische Zone unterstützt (Hill et al., 2004; Shichinohe et al., 2007). Die Hochregulierung von SDF1 in den SD-MSZ und in den mit NDM CET behandelten MSZ deutet daraufhin, dass es durch den Serumentzug bzw. durch das neurogene Medium NDM CET zu einer genetischen Umprogrammierung kommt. Eine vermehrte Sezernierung von Faktoren wie SDF-1 durch MSZ erklärt (neben anderen Faktoren) den positiven Einfluss von transplantierten Knochenmark-Zellen auf die (funktionelle) Regeneration von Nagern nach experimenteller Ischämie (Shichinohe et al., 2007; Yu et al., 2012).

Bei REX1 handelt es sich um einen Transkriptionsmarker, der in undifferenzierten embryonalen Stammzellen exprimiert wird. In verschiedenen Studien konnten Subpopulationen innerhalb des Knochenmarks identifiziert werden, die ebenfalls REX1 exprimierten. So wurden z. B. aus humanem Knochenmark pluripotente Stammzellen isoliert, die als *marrow-isolated adult multilineage inducible cells*, abgekürzt MIAMI-Zellen, bezeichnet werden. Genau wie die hier verwendeten MSZ wurden die MIAMI-Zellen aus dem gesamten nicht fraktionierten Knochenmark gewonnen. Die CD45-negativen Zellen exprimierten neben Markern der drei Keimblätter auch REX1 (D'Ippolito et al., 2004). Über eine stufenweise Induktion gelang den Autoren eine neurale Differenzierung, in deren Verlauf einige der Zellen die bipolare spindelförmige Morphologie neuraler Zellen annahmen und Nestin exprimierten. Auffallend ist hier die Ähnlichkeit zu den SD-MSZ, nicht nur in Bezug auf die Morphologie sondern auch auf die Hochregulierung von REX1 und Nestin. Gleiches konnte für die MSZ, die mit NDM PC inkubiert wurden, beobachtet werden. Es scheint also möglich zu sein, mit veränderten Kulturbedingungen MSZ in Zellen mit embryonalen und neuroektodermalen Stammzeleigenschaften bzw. Progenitorzeleigenschaften umzuwandeln. Auch durch eine initiale Fraktionierung des Knochenmarks konnten pluripotente Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden. MAPC (*multipotent adult progenitor cells*) (Jiang et al., 2002) und VSEL-Zellen (*very small embryonic like stem cells*) (Kucia et al., 2006) sind Beispiele dafür. Beide Zellarten exprimierten REX1. MAPC wirkten nach *in vivo* Injektion in die Blastozyste bei der Bildung aller drei Keimblätter mit (Jiang et al., 2002). VSEL-Zellen überlebten, wenn sie allein kultiviert wurden, *in vitro* mehrere Wochen ohne jedoch zu proliferieren oder zu differenzieren. Um eine Differenzierung zu induzieren, mussten die Zellen zusammen mit frisch isolierten Stromazellen des Knochenmarks mit Differenzierungsmedien kokultiviert werden. Die Autoren konnten zeigen, dass VSEL-Zellen unter anderem imstande waren neuroektodermale Marker (β III Tubulin, Nestin und O4) zu

exprimieren. Außerdem exprimierten diese Zellen CXCR4 (Kucia et al., 2006). Vergleicht man das Expressionsprofil der VSEL-Zellen mit dem der SD-MSZ, dann fallen die vielen Gemeinsamkeiten auf. Auch die SD-MSZ wiesen eine hohe Expressionsrate für β III Tubulin, Nestin, REX1 und CXCR4 auf. Bei den MSZ, die mit NDM PC kultiviert wurden, konnte eine signifikante Hochregulierung von Nestin und REX1 beobachtet werden.

Ein kompletter Serumentzug bzw. die Inkubation der MSZ mit NDM CET führte in dieser Arbeit zu einer Hochregulierung der Expression von c-Myc. c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der bei der Langzeiterhaltung des ES-Zell-Phänotyps eine Rolle spielt und der auf die Proliferation von ES-Zellen in Kultur unterstützend wirkt (Cartwright et al., 2005; Yamanaka, 2007). Zusammen mit Klf4, Oct4 und SOX2 sind es die vier Transkriptionsfaktoren, die für die Generierung der induzierten pluripotenten Stammzellen (*induced pluripotent stem cells, iPS cells*), welche ES-Zelleigenschaften aufweisen, benötigt werden. 2006 gelang es Takahashi und Yamanaka durch Überexpression dieser 4 Gene, aus Fibroblasten pluripotente Stammzellen zu induzieren (Takahashi und Yamanaka, 2006). Eines der größten Ziele der regenerativen Medizin ist es, aus körpereigenen Zellen pluripotente Stammzellen zu generieren. Die Hochregulierung von c-Myc in den SD-MSZ und NDM CET MSZ könnte ein Beweis dafür sein, dass durch einen Serumentzug oder durch Inkubation mit einem neurogenen Differenzierungsmedium aus MSZ pluripotente Stammzellen induziert werden können.

Die Ergebnisse mit den neurogenen Differenzierungsmedien (NDM) bekräftigen die Beobachtungen mit dem kompletten Serumentzug, bei denen es zu einer selektiven Proliferation kleiner, runder Zellen kommt, die zudem Marker von embryonalen und neuralen Stammzellen exprimieren (Sauerzweig et al., 2009a). Ob es dabei die gleichen Subpopulationen von Zellen sind, die auf die jeweiligen Differenzierungssignale reagieren, muss offen bleiben.

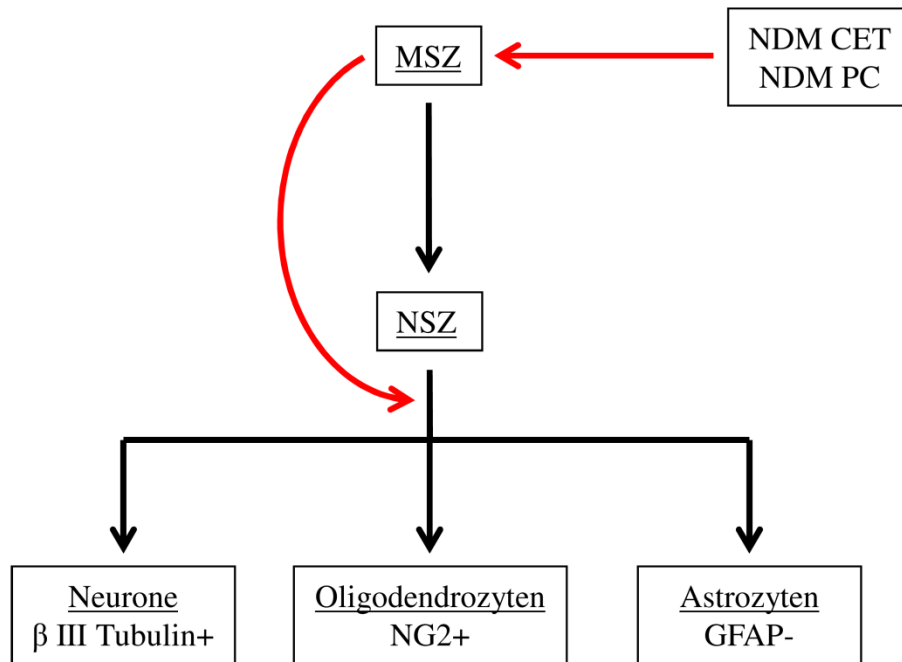


Abbildung 4.2: Differenzierung der MSZ durch neurogene Differenzierungsmedien.

MSZ können in NSZ differenzieren, die dann wiederum in die drei Hauptzelltypen des ZNS differenzieren: Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten (schwarze Pfeile). Durch die Inkubation der MSZ mit neurogenen Differenzierungsmedien differenzieren diese offenbar (unter Umgehung des NSZ-Stadiums) direkt in Neurone und Oligodendrozyten (rote Pfeile).

Das in Abbildung 4.2 dargestellte Schema macht noch einmal den Differenzierungsweg, der durch die Inkubation mit den NDM hervorgerufen wird, deutlich. Ein häufig in der Literatur beschriebener Weg ist die Umwandlung der MSZ in NSZ, z. B. durch Sphäruleninduktion, die dann weiter in die drei Hauptzelltypen des ZNS differenzieren können: Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten (siehe schwarze Pfeile) (Lee et al., 2003; Hermann et al., 2006; Kim et al., 2006; Fu et al., 2008; Yang et al., 2008). Durch den Einsatz der NDM scheint es jedoch zu einer direkten Differenzierung der MSZ in Neurone (β III Tubulin-positive Zellen) und Oligodendrozyten (NG2-positive Zellen) zu kommen. Es findet offensichtlich eine Umprogrammierung der MSZ unter Umgehung der NSZ statt (rote Pfeile). Unabhängig voneinander gelang es kürzlich zwei Forschungsgruppen, Fibroblasten direkt in Neurone umzuwandeln. Vierbuchen et al. fanden heraus, dass die Expression von drei für die neurale Entwicklungslinie spezifischen Transkriptionsfaktoren (Ascl1, Brn2, Myt1l) ausreichte, um embryonale und postnatale Fibroblasten der Maus in funktionale Neurone umzuwandeln (Vierbuchen et al., 2010). Die andere Forschungsgruppe dagegen war in der Lage, durch die Kombination von Überexpression zweier Gene (Ascl1, Ngn2) und gleichzeitiger Inhibierung des SMAD-Signalweges und der Glykogensynthase-Kinase 3β humane Fibroblasten direkt in Neurone zu konvertieren (Ladewig et al., 2012). Dass es ebenfalls möglich ist aus

Fibroblasten Oligodendrozyten zu generieren, zeigen zwei jüngst erschienene Arbeiten. Yang et al. gelang es durch forcierte Expression der Transkriptionsfaktoren Sox10, Olig2 und Zfp536, Fibroblasten der Maus und der Ratte in oligodendrozytäre Vorläuferzellen zu reprogrammieren (Yang et al., 2013). In der Arbeit von Kim et al. wird ein Protokoll beschrieben, wie mit Hilfe von vier Transkriptionsfaktoren (Sox2, Klf4, c-Myc und Pou3f4) Fibroblasten der Maus direkt in sich selbst erneuernde induzierte NSZ (iNSZ) umgewandelt werden können. Diese so generierten iNSZ waren in der Lage, *in vitro* in Neurone, Astrozyten sowie Oligodendrozyten zu differenzieren (Kim et al., 2014).

Auch bei den humanen MSZ erfolgte eine Differenzierung in Oligodendrozyten, was bemerkenswert war, da sich die hMSZ unter basalen Bedingungen deutlich von den rMSZ unterschieden. Es muss allerdings unterstrichen werden, dass die beschriebenen neuronalen Differenzierungen nur von transienter Dauer zu sein scheinen. Bereits nach 24 h hatten sich die meisten der neural differenzierten Zellen *de facto* wieder in mesenchymale Zellen zurückverwandelt. Offenbar induzieren die beschriebenen Medien eine genetische Umprogrammierung, die zwar mit einer Morphogenese der Zellstruktur verbunden ist, der aber für eine dauerhafte Differenzierung die entsprechenden Verschaltungssignale aus der Umgebung fehlen.

4.5 Auswirkungen der neurogenen Differenzierungsmedien unter nicht-adhärennten Kulturbedingungen

Da es ganz offensichtlich durch die beiden Differenzierungsmedien zu bemerkenswerten morphologischen, immunphänotypischen und genetischen Veränderungen in den adhärennt wachsenden MSZ kam, sollte der Einfluss dieser Medien nun auch unter nicht-adhärennten Bedingungen analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden MSZ in Bioreaktoren ausgesät und zusammen mit NDM CET und NDM PC kultiviert. Es stellte sich heraus, dass sich mit NDM CET Sphärulen-ähnliche Aggregate generieren ließen. Im Unterschied zu basalen MSZ-Sphärulen befanden sich allerdings noch sehr viele Einzelzellen in der Kultur. Außerdem waren die NDM CET Sphärulen nur locker zusammengelagert und bei weitem nicht so kompakt wie die basalen Sphärulen. Dagegen erschien NDM PC für die Induktion von Sphärulen ungeeignet zu sein. Die mikroskopischen Bilder zeigten, dass nur wenige Zellen diese Kulturbedingung überlebten und sich zu Sphärulen-ähnlichen Zellaggregaten zusammenlagerten. Der Grund für die fehlgeschlagene Induktion von Sphärulen mittels NDM PC kann daran liegen, dass diesem Medium laut Herstellerangaben kein Serum hinzugefügt werden soll. Sauerzweig konnte in seiner Arbeit zeigen, dass serumhaltiges Medium für die

Induktion von Neurosphärulen-ähnlichen Strukturen aus rMSZ unabdingbar ist (Sauerzweig, et al., 2009a). Eine andere Erklärung kann mit dem in Abbildung 4.2 gezeigten Schema geliefert werden. Die durch die NDM hervorgerufene Umprogrammierung der MSZ umgeht offensichtlich die Umwandlung in NSZ. Diese beschriebene genetische Umprogrammierung scheint adhärente Wachstumsbedingungen vorauszusetzen. Im Gegensatz dazu inhibierte NDM PC nicht nur die Sphärulenbildung unter nicht-adhärennten Bedingungen, sondern wirkte unter diesen Umständen sogar toxisch.

Um Aussagen über die in den Sphärulen befindlichen Zellen zu treffen, wurden diese immunzytochemisch untersucht. Dazu mussten sie auf Deckgläschen ausgesät und nach 2 bzw. 24 h fixiert werden. Während dieser Zeit wurden die Sphärulen im entsprechenden Medium weiterkultiviert. Die NDM CET Sphärulen zeigten 2 h nach der Aussaat eine positive Expression von Nestin und NG2. Nach 24 h waren vermehrt Zellen aus den Sphärulen ausgewachsen, die kein Nestin exprimierten sondern hauptsächlich NG2-positiv waren. Morphologisch erinnerten die auswachsenden Zellen an die SD-MSZ bzw. VSEL-Zellen. Die runden bis bipolar spindelförmigen Zellen konnten immunphänotypisch jedoch weder zu den SD-MSZ noch zu den VSEL-Zellen gezählt werden. Vergleiche der mit NDM CET behandelten Sphärulen (nicht-adhärennte Kulturbedingungen) mit MSZ, die unter adhärennten Bedingungen mit NDM CET kultiviert wurden, ergaben, dass mit NDM CET induzierte Sphärulen kein β III Tubulin exprimierten. Wie die Phasenkontrastaufnahmen schon vermuten ließen, hatte das NDM PC während der Sphäruleninduktion eine eher toxische als neuronal differenzierende Wirkung. Abgesehen von einer äußerst schwachen Nestin- und NG2-Expression war anhand der mit DAPI angefärbten Zellkerne ersichtlich, dass die Sphärulen-artigen Zellcluster aus nur sehr wenigen Zellen bestanden. Aus humanen mesenchymalen Stammzellen konnten weder mit NDM CET noch mit NDM PC Sphärulen-ähnliche Zelleaggregate induziert werden.

Die videomikroskopischen Aufnahmen, die vom Anwachsen der MSZ-Sphärulen, die unter basalen Bedingungen mit Sphärulen-Standardmedium induziert wurden, und von Sphärulen, die mit NDM CET induziert wurden, angefertigt wurden, ließen eindeutige morphologische Unterschiede erkennen. So adhärten die NDM CET Sphärulen wesentlich schneller auf der Zellkulturoberfläche und begannen mit dem Auswachsen. Die auswachsenden Zellen der mit Sphärulen-Standardmedium induzierten Sphärulen wiesen die für MSZ typische Fibroblasten-artige Gestalt auf. Die Zellen, die aus den NDM CET Sphärulen auswuchsen, hatten dagegen ein viel verzweigteres Erscheinungsbild, was

wiederum daraufhin wies, dass es durch NDM CET neben den immunphänotypischen Unterschieden auch zu morphologischen Veränderungen kam.

4.6 Differenzierung der rMSZ in Ko-Kultur in neurale Zelltypen

Dass es sich bei den zuvor beschriebenen neuronalen Differenzierungsvorgängen nur um ein transientes Phänomen handelte, könnte damit erklärt werden, dass den MSZ in Einzelkultur womöglich bestimmte Faktoren oder Strukturen fehlten, die eine länger anhaltende Differenzierung hervorriefen. Daraus ergab sich die Frage, ob eine Ko-Kultivierung der MSZ mit kortikalen Primärkulturen vergleichbare Differenzierungseffekte auslöst.

Ein grundsätzliches Problem der Stammzellen-Forschung ist, dass für die optimale Entwicklung transplanteder Zellen diese mit dem Empfängergerewebe immunologisch bestmöglich übereinstimmen sollten. In verschiedenen Studien werden allerdings humane Zellen in Mäusen oder Ratten bzw. in deren *ex vivo* Gewebe untersucht. Dieser Ansatz der Xenotransplantation hat zur Folge, dass immunologische Reaktionen des Empfängergerewebes das volle Entwicklungspotential der humanen Zellen begrenzen. Arbeiten von Braun et al. belegen, dass 7 Tage nach Transplantation humaner iPS-Zellen in kortikale Primärkulturen embryonaler Ratten die humanen Zellen degenerieren und durch Mikrogliazellen phagozytiert werden (Braun et al., 2012). Ein Ausweg aus diesem Dilemma ist die Untersuchung von Rattenzellen in Rattengerewebe. Hier steht man nun wiederum vor dem Hindernis, die zu untersuchenden Zellen so zu markieren, dass sie vom Empfängergerewebe unterscheidbar sind. Eine Möglichkeit Zellen anzufärben, bieten sogenannte Vitalfarbstoffe. Vorversuche mit solchen Farbstoffen (Mitotracker, CM DiI) brachten jedoch nicht den gewünschten Erfolg. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit BrdU zur Markierung der rMSZ verwendet. BrdU (5-Brom-2-Desoxyuridin) ist ein Thymidin-Analogon, welches während der S-Phase des Zellzyklus an Stelle von Thymidin in den neu synthetisierten DNS-Strang eingebaut wird. Mit spezifischen Antikörpern können dann Zellen mit einem BrdU-positiven Zellkern nachgewiesen werden. Dass BrdU ein geeigneter Marker für proliferierende Zellen ist, zeigen diverse *in vitro* und *in vivo* Studien (Baldauf und Reymann, 2005; Schmidt und Reymann, 2002; Laskowski et al., 2007; Chechneva et al., 2006). Wie bei allen Zellmarkierungsmethoden gibt es neben den spezifischen Vorteilen jedoch auch Nachteile bei der Markierung mit BrdU. Sauerzweig und Kollegen untersuchten sowohl die Quantifizierung der BrdU-positiven MSZ als auch die Intensität von BrdU im Zellkern über die Zeit. Es stellte sich heraus, dass sich mit fortschreitender Kultivierungsdauer die Anzahl BrdU-positiver MSZ reduzierte. Außerdem kam es zu Modifikationen im Verteilungsmuster des BrdU.

17 Tage nach BrdU-Gabe war BrdU nicht mehr im Zellkern, sondern im Zytosol zu finden. Trotz all dieser Nachteile ist und bleibt BrdU ein unverzichtbares Werkzeug, um lebende Zellen zu markieren. Das trifft besonders auf Experimente zu, deren Versuchsdauer 2 Wochen nicht übersteigt (Sauerzweig et al., 2009b).

In der vorliegenden Arbeit wurden die mit BrdU-markierten rMSZ mit zwei Tage alten kortikalen Primärkulturen für 24 bzw. 48 Stunden kokultiviert. Mithilfe von immunzytochemischen Färbungen konnten die Ko-Kulturen analysiert werden. Es ist bemerkenswert, dass nach nur 24-stündiger Ko-Kultivierung Zellen detektiert werden konnten, die sowohl NG2 als auch BrdU exprimierten. Es musste sich dabei also um in Oligodendrozyten differenzierte rMSZ handeln. Rivera und Kollegen konnten beobachten, dass neurale Stammzellen (NSZ), die mit MSZ kokultiviert werden, bevorzugt in Oligodendrozyten differenzieren. Sie zeigten, dass lösliche Faktoren aus konditioniertem MSZ-Medium für die oligodendrogenen Effekte verantwortlich sind (Rivera et al., 2006). In weiterführenden Experimenten untersuchten Rivera et al., ob die pro-oligodendrogenen Effekte auch nach Transplantation in hippokampale Schnittkulturen der Ratte erhalten blieben. Es stellte sich heraus, dass die NSZ nur dann überlebten und in Oligodendrozyten differenzierten, wenn sie zusammen mit den MSZ in die hippokampalen Schnittkulturen transplantiert wurden. Eine Vorbehandlung der NSZ mit konditioniertem MSZ-Medium und darauf folgender Transplantation ohne MSZ führte zum Absterben der NSZ. Unbehandelte NSZ, die ohne MSZ transplantiert wurden, differenzierten hauptsächlich in Astrozyten (Rivera et al., 2009).

Einer anderen Forschergruppe gelang es, mesenchymale Stammzellen *in vitro* durch chemische Agenzien in Oligodendrozyten-ähnliche Zellen zu differenzieren. Die Differenzierung erfolgte über ein mehrstufiges Protokoll. Im Präinduktionsschritt wurden die MSZ mit DMSO und Retinsäure behandelt. An diesem Punkt des Differenzierungsprotokolls konnten keine für Oligodendrozyten typischen Marker (O4, O1, MBP) detektiert werden. Im Induktionsschritt wurden die MSZ dann mit bFGF, PDGF, HRG gefolgt von Triiodthyronin behandelt, was zur Differenzierung der MSZ in Oligodendrozyten-ähnliche Zellen führte (Kaka et al., 2012). Differenzierungen, die auf Einwirkung durch chemische Agenzien hervorgerufen werden, sollten jedoch kritisch betrachtet werden. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Differenzierungen auf einer stressbedingten Anpassung des Zytoskeletts beruhten (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004).

Zusätzlich zu der Differenzierung in Oligodendrozyten waren in der vorliegenden Arbeit nach Ko-Kultivierung für 48 h BrdU-positive rMSZ nachweisbar, die Nestin koexprimierten.

Nestin ist ein allgemein anerkannter Marker für neurale Stammzellen und sich entwickelndes Nervengewebe. Unter basalen Kulturbedingungen exprimierten die rMSZ kein Nestin. Auch die Behandlung der rMSZ mit den NDM führte nicht zur Nestin-Expression. Das deutet darauf hin, dass die Ko-Kultivierung mit der kortikalen Primärkultur die optimalste Wachstumsbedingung darstellt, um spontane neuronale Differenzierungen nachzuweisen. Weil neben löslichen Faktoren auch strukturelle Einflüsse wie Zell-Zell-Kontakte eine Rolle spielen, kann durch die Ko-Kultivierung neben der Differenzierung von BrdU-positiven rMSZ in Oligodendrozyten nun auch eine Differenzierung in neurale Stammzellen (durch Expression von Nestin) nachgewiesen werden. Damit wird auch deutlich, dass in der Ko-Kultivierung ein anderer Differenzierungsweg eingeschlagen wird als bei der Kultivierung mit den NDM. Prinzipiell sollten diese aus MSZ entstandenen Nestin-positiven Zellen in der Lage sein, neben Oligodendrozyten auch Neurone zu bilden. Dies jedoch erfordert möglicherweise eine längere Kokultivierung mit neuralem Gewebe, wie sie nur nach Transplantation in Ratten möglich ist.

Weiterhin konnte durch die immunzytochemischen Färbungen gezeigt werden, dass die baumartigen Fortsätze der NG2-positiven Oligodendrozyten, die sich aus den rMSZ entwickelt hatten, enge Kontakte zu β III Tubulin-positiven kortikalen Neuronen ausbildeten. Diese Beobachtungen konnten von Braun et al. bekräftigt werden. Sie untersuchten humane iPS-Zellen (hiPS-Zellen) in Ko-Kultur mit kortikalen Primärkulturen, welche unter diesen Wachstumsbedingungen in Neurone differenzierten. Es bildeten sich enge Kontakte zwischen den dendritischen und axonalen Fortsätzen der hiPS-Zellen und den Oligodendrozyten der Primärkultur. Die Autoren vermuteten, dass diese Kontakte essentiell für die funktionelle Integration der von hiPS-Zellen abstammenden Neurone in das neuronale Netzwerk der kortikalen Primärkultur waren (Braun et al., 2012). Die Vermutung liegt nahe, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Kontakte zwischen den in Oligodendrozyten differenzierten rMSZ und den Neuronen der kortikalen Primärkultur aus dem gleichen Grund zustande gekommen sind.

4.7 Neuronale Differenzierung von MSZ aus der Ratte

Eine charakteristische Eigenschaft neuraler Stammzellen (NSZ) ist deren Fähigkeit, unter nicht-adhärenenten Wachstumsbedingungen Neurosphärulen auszubilden. Wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben, gilt das von Reynolds und Weiss entdeckte Attribut seither als *in vitro* Nachweis für NSZ (Reynolds und Weiss, 1992). Mesenchymale Stammzellen sind ebenfalls in der Lage Neurosphärulen zu generieren. Wurde die Induktion ursprünglich unter serumfreien Bedingungen etabliert (Wislet-Gendebien et al., 2003; Hermann et al., 2004), fand Sauerzweig et al. heraus, dass die Zugabe von Serum zu einer deutlich effizienteren Ausbildung von Neurosphärulen bei rMSZ führt (Sauerzweig et al., 2009a).

Die neuronale Differenzierung einer aus dem Mesoderm abstammenden Zelle, wie den mesenchymalen Stammzellen, in eine neuroektodermale Zelle, wie den Neuronen, erfordert die Überwindung der Keimblattgrenzen. Nach wie vor ist die Skepsis groß, wenn über neuronale Differenzierungen berichtet wird. Vor über 10 Jahren wurde in unterschiedlichen Studien beschrieben, dass MSZ in neuronale Zellen differenzieren, was aufgrund der Expression bestimmter Markerproteine (NeuN, NSE, NF-M, β III Tubulin, TUC-4) gezeigt werden konnte (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000; Woodbury et al., 2002; Munoz-Elias et al., 2003). Jedoch konnte mittlerweile ein Teil der Ergebnisse widerlegt werden, da es sich um eine durch chemischen Stress (Zugabe chemischer Agenzien wie BHA, BME, DMSO) verursachte Anpassung des Zytoskeletts handelte (Bertani et al., 2005; Croft und Przyborski, 2006). Um von einer tatsächlichen neuronalen Differenzierung zu sprechen, müssen einige Kriterien erfüllt werden. Dazu gehört die Expression von kritischen neuronalen Markerproteinen wie DCX, gekoppelt mit einer typischen neuronalen Morphologie.

Dass es möglich ist, aus mesenchymalen Stammzellen Neurosphärulen zu induzieren, wurde schon in Kapitel 4.3 ausführlich beschrieben. Um die MSZ-Sphärulen weiter zu charakterisieren, wurden diese nach der Induktion unter nicht-adhärenenten Bedingungen auf Deckgläschen ausgesät und unter den gleichen adhärenenten Bedingungen wie kortikale Primärkulturen wachsen gelassen. Nach 24 h bzw. 48 h wurden die MSZ-Kulturen fixiert und immunzytochemisch untersucht. Bei der anschließenden Fluoreszenzmikroskopie konnten von insgesamt 50 Neurosphärulen einige wenige Neurosphärulen entdeckt werden, die ein besonderes Markerprofil aufzeigten. Aus diesen MSZ-Sphärulen waren Zellen gewachsen, die doppelt positiv für β III Tubulin und DCX, beides Marker für Neurone, waren. Die Expression des Zytoskelettmarkers DCX ist ein entscheidendes Kriterium für neuronale Differenzierung. Während β III Tubulin auch in nicht neuronalen Zellen, wie z. B. in humanen MSZ (siehe Kapitel 4.2) exprimiert wurde, scheint die Expression von DCX auf

junge Neurone beschränkt zu sein (Brown et al., 2003; Couillard-Despres et al., 2005). Die hier aus rMSZ induzierten Neurosphärulen wiesen eine erstaunliche Ähnlichkeit zu den Sphärulen aus kortikalen Primärkulturen auf (vgl. Abbildung 3.34 A mit Abbildung 3.36 C). Des Weiteren zeigten die Neurosphärulen ein beginnendes Netzwerk von β III Tubulin-positiven Zellen, die mit Nestin-positiven Stammzellen vermischt waren - ein Bild, das man so sonst nur von kortikalen Primärkulturen kennt (vgl. Abbildung 3.35 A mit Abbildung 3.36 F). Es liegt also die Vermutung nahe, dass die vorherige Induktion in Neurosphärulen bei wenigen MSZ zu einer genetischen Reprogrammierung führt, deren Ergebnis die Entstehung neuraler Stammzellen ist. Diese reprogrammierten Zellen könnten dann nach dem Anwachsen der Sphärulen ein beginnendes Netzwerk neuronaler Zellen ausbilden. Es bleibt allerdings abzuwarten, ob sich diese Ergebnisse reproduzieren lassen.

Dass nur maximal 2 von 50 Neurosphärulen dieses spezielle Markerprofil aufwiesen, ist ein Beleg dafür, dass es sich bei den mesenchymalen Stammzellen um eine äußerst heterogene Zellpopulation handelt (Loutit et al., 1982; Ratajczak et al., 2004; Kucia et al., 2005; Johnson et al., 2005). Nur wenn die äußeren Kultivierungsbedingungen auf bestimmte intrinsische Zustände treffen, ist eine neuronale Differenzierung der rMSZ möglich. Die Studien von Sauerzweig und Kucia zeigen, dass nur bestimmte Subpopulationen der MSZ in der Lage sind, in neuronale Zellen zu differenzieren. Sauerzweig beschreibt in seiner Arbeit kleine Nestin-positive MSZ innerhalb primärer Knochenmarkstammzell-Kulturen der Ratte, die durch einen kompletten Serumentzug eine Population von bipolaren oder runden Zellen hervorrufen. Diese exprimieren Marker embryonaler und neuraler Stammzellen und werden als Serumdeprivations-induzierte MSZ, SD-MSZ, bezeichnet (Sauerzweig et al., 2009a). Kucia identifizierte aus murinem Knochenmark eine Population pluripotenter Stammzellen, die aufgrund ihrer Morphologie und der Expression verschiedener Marker (CXCR4, SSEA-1, Oct-4) undifferenzierten embryonalen Stammzellen ähneln. Zudem differenzieren diese VSEL-Zellen (*very small embryonic like stem cells*) in *in vitro* Kulturen in Zellen aller drei Keimblätter. Kucia vermutet, dass es sich bei den VSEL-Zellen um Reste embryonaler Stammzellen handelt, die auch noch im Erwachsenenalter im Knochenmark angesiedelt sind. Interessanterweise nimmt die Anzahl der VSEL-Zellen mit zunehmendem Alter ab, was die effizienteren Regenerationsprozesse in jungen Individuen erklärt (Kucia et al., 2006). Möglicherweise sind es solche Subpopulationen von Zellen, die sich durch ein besonderes Expressionsprofil von den anderen Fibroblasten-ähnlichen Zellen unterscheiden und während des Sphärulenwachstums eine neuronale Umprogrammierung erfahren.

Einer anderen Forschungsgruppe ist es dagegen gelungen, humane Fibroblasten in Neurone zu konvertieren. Durch die Inhibierung von GSK-3 β (Glykogensynthase-Kinase 3 β) und des SMAD-Signalweges und gleichzeitiger Überexpression der Gene *Ascl1* (*Achaete scute* homolog 1) und *Ngn2* (Neurogenin 2) kommt es zu einer effektiven Umwandlung in Neurone. Die Autoren vermuten durch die Inhibierung des SMAD-Signalweges eine mesenchymale-epitheliale Umwandlung der Fibroblasten (Ladewig et al., 2012). Es ist möglich, dass die Induktion der Neurosphärulen eine ähnliche Transformation in wenigen MSZ hervorruft, die unter adhärennten Bedingungen in neuronale Zellen ausdifferenzieren. Dies erklärt, warum die Kokultivierung mit kortikalen Primärkulturzellen einerseits und die Induktion in Sphärulen andererseits MSZ hervorbringt, die eindeutige morphologische Eigenschaften und Markerproteine besitzen, die (I) neuronalen Stammzellen, (II) Oligodendrozyten und (III) in sehr seltenen Fällen Neuronen entsprechen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um diese Ergebnisse zu bestätigen und das Vorhandensein von neuronalen Eigenschaften auch auf elektrophysiologischer Ebene zu bestätigen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (MSZ) stellen eine autologe Quelle von Stammzellen dar, die für die Behandlung neurodegenerativer Krankheiten verwendet werden können. MSZ sind fähig, in Zelltypen des mesodermalen Gewebes (Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten) zu differenzieren. Es gibt Hinweise, dass MSZ immunmodulatorische Eigenschaften besitzen. Dies wird experimentell in allogenen aber auch autologen Transplantationen untersucht. Einerseits könnte die Ko-Transplantation von MSZ zu einer Verminderung der *graft versus host* Reaktionen führen, andererseits gibt es Überlegungen, MSZ in autologen Transplantationen bei der Behandlung von Multipler Sklerose einzusetzen. Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien zeigen, dass MSZ durch Sezernierung zahlreicher Wachstumsfaktoren neuroprotektive Eigenschaften besitzen.

Immer wieder gab es Anhaltspunkte, dass MSZ auch in neuroektodermales Gewebe, wie Neurone und Gliazellen, differenzieren können. Eine Differenzierung in funktionierende Neurone, ähnlich wie es bei embryonalen Stammzellen zu beobachten ist, konnte bisher für MSZ nicht nachgewiesen werden. Arbeiten von Sauerzweig et al. konnten allerdings in Übereinstimmung mit anderen Forschergruppen deutliche Hinweise finden, dass das Knochenmark einen geringen Anteil pluripotenter Stammzellen enthält, die auch als Subpopulationen von kleinen, runden Zellen in den MSZ-Kulturen zu finden sind (Sauerzweig et al., 2009a, Kucia et al., 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von MSZ in *in vitro* Kulturen auf das Vorhandensein weiterer Subpopulationen mit neuralem Differenzierungspotential. Dazu wurden spezielle Wachstumsbedingungen und Kokultivierungen mit neuronalen Zellen getestet, um diese Subpopulationen selektiv anzureichern. Es stellte sich heraus, dass zwei kommerziell erhältliche neurogene Differenzierungsmedien (NDM) sowohl bei MSZ der Ratte als auch bei MSZ humanen Ursprungs innerhalb weniger Stunden eine deutliche Differenzierung vieler Zellen in kleine kugelförmige Zellen induzierten. Einige dieser Zellen zeigten zusätzlich eine hohe Expression von β III Tubulin. Allerdings waren sowohl das Expressionsmuster von β III Tubulin als auch die Morphologie nicht mit denen junger Neurone vergleichbar. Überraschenderweise fanden sich auch Zellen, die NG2-positiv waren und sich morphologisch nicht von jungen Oligodendrozyten in einer kortikalen Primärkultur unterschieden. Mittels Videomikroskopie konnte gezeigt werden, dass der NDM-Effekt zum einen zeitlich auf die ersten 4 bis 8 Stunden begrenzt und zum anderen reversibel war. Wie qRT-PCR-Untersuchungen an ausgewählten Genen ergaben, führte die Kultivierung der

rMSZ mit den NDM zu signifikanten Veränderungen in der Genexpression. Eine noch stärkere Änderung der Aktivität dieser Gene wurde durch Serumentzug erreicht, der gleichzeitig die selektive Vermehrung von pluripotenten SD-MSZ bewirkte. Die qRT-PCR-Daten sind ein wichtiger Beleg dafür, dass durch die Inkubation mit neuronalen Differenzierungsmedien bzw. durch Serumentzug in den MSZ eine genetische Umprogrammierung ausgelöst werden kann, die zu einer Anreicherung pluripotenter Stammzellen führt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Frage bearbeitet, ob eine Ko-Kultivierung der MSZ mit kortikalen Primärkulturzellen ähnliche Differenzierungsphänomene auslöst. Es stellte sich heraus, dass auch unter diesen Kulturbedingungen mesenchymale Stammzellen in NG2-positive Zellen differenzierten, die morphologisch nicht von jungen Oligodendrozyten einer kortikalen Primärkultur zu unterscheiden waren. Interessanterweise zeigten die baumartigen Fortsätze der NG2-positiven Oligodendrozyten, die sich aus den MSZ entwickelt hatten, enge Kontakte zu β III Tubulin-positiven kortikalen Neuronen, so wie es auch bei kortikalen Oligodendrozyten beobachtet werden kann. Zusätzlich waren auch MSZ nachweisbar, die Nestin exprimierten und als solche nicht von Nestin-positiven neuronalen Stammzellen zu unterscheiden waren. Diese Differenzierung von mesenchymalen Knochenmarkszellen in Oligodendrozyten könnte für die Behandlung der Multiplen Sklerose von Interesse sein, wenn weitere Arbeiten die volle Funktionsfähigkeit dieser Zellen wie z. B. die Myelinisierung von Axonen zeigen sollten.

Eine dritte Möglichkeit MSZ zur Differenzierung anzuregen, ist die Sphäruleninduktion. MSZ-Sphärulen enthielten Zellen, die Nestin, β III Tubulin, NG2 und in geringem Maße GFAP exprimierten, ähnlich wie Sphärulen aus kortikalen Primärkulturzellen. In einigen wenigen Fällen konnten Sphärulen von mesenchymalen Zellen nachgewiesen werden, aus denen Zellen auswuchsen, die von Neuronen einer Primärkultur nicht zu unterscheiden waren und die gleichzeitig das typische Muster von β III Tubulin und DCX exprimierten. Die Expression von DCX ist ein maßgebliches Charakteristikum für eine tatsächliche neuronale Differenzierung. Diese eindeutig neuronalen Zellen bildeten genau wie Neurone aus Primärkulturen ein neuronales Netzwerk von β III Tubulin-/DCX-positiven Zellen, die mit Nestin-positiven Stammzellen vermischt waren. Sollten weitere Untersuchungen diese selten auftretenden Phänomene bestätigen, dann wäre erstmalig gezeigt, dass die Induktion von Sphärulen bei mesenchymalen Stammzellen in einer geringen Frequenz zu einer spontanen neuronalen Differenzierung führt.

6 ABSTRACT

Mesenchymal Stem Cells (MSC) derived from the bone marrow represent an autologous source of stem cells potentially suitable for the treatment of neurodegenerative diseases. MSC can differentiate into mesodermal cells like adipocytes, chondrocytes as well as osteoblasts. Further, it is described that MSC possess immunomodulatory features. This is investigated by allogeneic but also autologous transplantation experiments. By co-transplantation MSC could cause a reduction of the *graft versus host* reaction. Further, it is considered to use MSC for the treatment of multiple sclerosis by an autologous approach. Multiple *in vitro* and *in vivo* studies illustrate that MSC mediate neuroprotective actions by secretion of various growth factors.

Numerous studies have provided indications for the differentiation of MSC into neuroectodermal lineage like neurons and glial cells. However, the unambiguous generation of functioning neurons from MSC has not been demonstrated so far. Nevertheless, findings of Sauerzweig et al. are in accordance with other published results that the bone marrow harbours a small fraction of pluripotent stem cells which are detectable as subpopulations of small, rounded cells in MSC *in vitro* cultures (Sauerzweig et al., 2009a, Kucia et al., 2006).

This work investigated MSC *in vitro* cultures for the presence of additional subpopulations with neural differentiation potential. For this purpose, special growth conditions and co-cultures with neural cells have been tested in order to enrich such subpopulations. It became apparent that two commercially available neurogenic differentiation media (NDM) induce in both, MSC from rats and human a distinct differentiation of many cells into small, rounded cells within hours. Some of these cells displayed a high expression of β III tubulin. However, both, the morphology and expression pattern of β III tubulin are not concordant with those of genuine young neurons. Surprisingly, we have also found cells being positive for NG2 and exhibiting the similar morphology as young oligodendrocytes within a cortical primary culture. By video-microscopy it could be demonstrated that this NDM-effect was reversible and lasted only 4-8 hours. As qRT-PCR measurements on selected genes revealed the cultivation of MSC in NDM led to significant changes in gene expression. An even stronger change in gene activity was induced by serum deprivation which simultaneously activates the proliferation of pluripotent SD-MSC. PCR-data argue that the incubation with neuronal differentiation media as well as serum deprivation release a genetic reprogramming which results in an enrichment of pluripotent stem cells.

In a second part it was asked whether a co-cultivation of MSC with a cortical primary culture initiates similar differentiation phenomena. Indeed, such a co-cultivation also produced NG2 positive cells from MSC which could not be distinguished from young bona fide oligodendrocytes present in cortical primary cultures. Interestingly, derived oligodendrocytes also developed ramified processes entering tight contacts to β III tubulin positive cortical neurons. In addition, by co-cultivation with neural cells MSC also generated nestin positive cells morphologically resembling nestin expressing neural stem cells *in vitro*. The differentiation of mesenchymal cells from the bone marrow into oligodendrocytic precursors might have great potential for the treatment of multiple sclerosis, provided that further experiments can prove the ability of those cells to produce myelin and ensheath axons.

A third approach to initiate differentiation is the induction of neurospheres from MSC. Neurospheres derived from MSC contained cells expressing nestin, β III tubulin or NG2 and to some extent GFAP, similar to neurospheres derived from cortical primary cells. Occasionally, it could be proven that cells which arose from MSC-neurospheres were not discriminable from neurons within a cortical primary culture and simultaneously expressed a neuronal pattern of β III tubulin and DCX. DCX is one of the strongest neuronal marker proteins. Thus, these definite neuronal cells formed a neuronal network of β III tubulin/DCX positive cells intermingled with MSC derived nestin positive stem cells. Providing that further experiments confirm these rare cases of neuronal differentiation, these results for the first time demonstrate that the induction of neurospheres can cause a spontaneous neuronal differentiation in mesenchymal stem cells.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Altman, J.** (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127-1128.
- Altman, J. and Das, G. D.** (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319-335.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M. and Tramontin, A. D.** (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 287-293.
- Bai, L., Lennon, D. P., Eaton, V., Maier, K., Caplan, A. I., Miller, S. D., Miller, R. H.** (2009) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia* 57, 1192-1203.
- Baldauf, K. and Reymann, K. G.** (2005). Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia. *Brain Res.* 1056, 158-167.
- Bertani, N., Malatesta, P., Volpi, G., Sonego, P. and Perris, R.** (2005). Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J. Cell Sci.* 118, 3925-3936.
- Bianco, P.** (2011). Back to the future: moving beyond “mesenchymal stem cells”. *J. Cell. Biochem.* 112, 1713-1721
- Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C. and Vescovi, A. L.** (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-537.
- Boya, J., Calvo, J. and Prado, A.** (1979) The origin of microglial cells. *J. Anat.* 129, 177-186.
- Braun, H., Bühnemann, C., Neumann, J. and Reymann, K.G.** (2006) Preparation of a tissue-like cortical primary culture from embryonic rats using Matrigel and serum free Start V Medium. *J. Neurosci. Methods* 157, 32-38.
- Braun, H., Günther-Kern, A., Reymann, K. G. and Onteniente, B.** (2012) Neuronal Differentiation of human iPS-cells in a rat cortical primary culture. *Acta Neurobiol. Exp.* 72, 219-229.
- Brown, J. P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L. and Kuhn, H. G.** (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 467, 1-10.
- Buga, A.-M., Vintilescu, R., Pop, O. T. and Popa-Wagner, A.** (2011) Brain Aging and Regeneration after Injuries: an Organismal approach. *Aging Dis.* 2, 64-79.

- Cameron, H. A. and McKay, R. D.** (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 435, 406-417.
- Caplan, A. I.** (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641-650.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K. and Dalton, S.** (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885-896.
- Cattaneo, E. and McKay, R.** (1990). Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347, 762-765.
- Chechneva, O., Dinkel, K., Cavaliere, F., Martinez-Sanchez, M. and Reymann, K. G.** (2006). Anti-inflammatory treatment in oxygen–glucose-deprived hippocampal slice cultures is neuroprotective and associated with reduced cell proliferation and intact neurogenesis. *Neurobiol Dis.* 23, 247-259.
- Chen, X., Li, Y., Wang, L., Katakowski, M., Zhang, L., Chen, J., Xu, Y., Gautam, S. C. and Chopp, M.** (2002). Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology* 22, 275-279.
- Chen, J., Zhang, G. Z., Li, Y., Wang, L., Xu, Y. X., Gautam, S. C., Lu, M., Zhu, Z. and Chopp, M.** (2003). Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ. Res.* 92, 692-699.
- Cohnheim, J.** (1867). Über Entzündung und Eiterung. *J. Arch. Path. Anat. Physiol. Klin. Med.* 40, 1–79.
- Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., Winkler, J., Kuhn, H. G. and Aigner, L.** (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1–14.
- Croft, A. P. and Przyborski, S. A.** (2006). Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem Cells.* 24, 1841-1851.
- D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G. A., Menei, P., Roos, B. A. and Schiller, P. C.** (2004). Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J. Cell Sci.* 117, 2971-2981.
- Docheva, D., Padula, D., Popov, C., Mutschler, W., Clausen-Schaumann, H. and Schieker, M.** (2008). Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 537-552.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. and Mavilio, F.** (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530.

- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. and Lalykina, K. S.** (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3, 393-403.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. and Kulagina, N. N.** (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267-274.
- Goldman, S. A. and Nottebohm, F.** (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 2390-2394.
- Fu, L., Zhu, L., Huang, Y., Lee, T. D., Forman, S. J., Shih, C. C.** (2008). Derivation of neural stem cells from mesenchymal stem cells: evidence for a bipotential stem cell population. *Stem cells and development.* 17, 1109-1121.
- Gritti, A., Frolichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E. A., Cova, L., Pagano, S. F., Bjornson, C. R. and Vescovi, A. L.** (1999). Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J. Neurosci.* 19, 3287-3297.
- Haasters, F., Prall, W. C., Anz, D., Bourquin, C., Pautke, C., Endres, S., Mutschler, W., Docheva, D., and Schieker, M.** (2009). Morphological and immunocytochemistry characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymale stem cell culturing. *J Anat.* 214, 759-767.
- Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M. O., Fiedler, J., Boehm, B. O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R. and Storch, A.** (2004). Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* 117, 4411-4422.
- Hermann, A., Maisel, M., Liebau, S., Gerlach, M., Kleger, A., Schwarz, J., Kim, K. S., Antoniadis, G., Lerche, H. and Storch A.** (2006). Mesodermal cell types induce neurogenesis from adult human hippocampal progenitor cells. *J. Neurochem.* 98, 629-640.
- Hitoshi, S., Tropepe, V., Ekker, M. and van der Kooy, D.** (2002). Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. *Development* 129, 233-244.
- Hill, W. D., Hess, D. C., Martin-Studdard, A., Carothers, J. J., Zheng, J., Hale, D., Maeda, M., Fagan, S. C., Carroll, J. E. and Conway, S. J.** (2004). SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 84-96.
- Imitola, J., Raddassi, K., Park, K. I., Mueller, F. J., Nieto, M., Teng, Y. D., Frenkel, D., Li, J., Sidman, R. L., Walsh, C. A., Snyder, E. Y. and Khoury, S. J.** (2004). Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 18117-18122.
- Jensen, J. B. and Parmar, M.** (2006). Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol. Neurobiol.* 34, 153-161.

- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A. and Verfaillie, C. M.** (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T. and Tilly, J. L.** (2005). Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. *Cell* 122, 303-315.
- Jones, E. and McGonagle, D.** (2008). Human bone marrow mesenchymal stem cells *in vivo*. *Rheumatology* 47, 126-131.
- Kaka, G. R., Tiraihi, T., Delshad, A., Arabkheradmand, J. and Kazemi H.** (2012). In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as inducer. *Int. J. Neurosci.* 122, 237-247.
- Keilhoff, G., Goihl, A., Langnäse, A., Fansa, H. and Wolf, G.** (2006). Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *Eur. J. Cell. Biol.* 85, 11-24.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M. and Verkhratsky, A.** (2011). Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461-553.
- Kim, S., Honmou, O., Kato, K., Nonaka, T., Houkin, K., Hamada, H. and Kocsis, J. D.** (2006). Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells. *Brain research* 1123, 27-33.
- Kim, S. M., Fläßkamp, H., Hermann, A., Araújo-Bravo, M. J., Lee, S. C., Lee, S. H., Seo, E. H., Lee, S. H., Storch, A., Lee, H. T., Schöler, H. R., Tapia, N. and Han, D. W.** (2014). Direct conversion of mouse fibroblasts into induced neural stem cells. *Nat. Protoc.* 9, 871-881.
- Kopen, G. C., Prockop, D. J. and Phinney, D. G.** (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10711-10716.
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S. and Sharkis, S. J.** (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.
- Kucia, M., Reca, R., Jala, V. R., Dawn, B., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. Z.** (2005). Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia* 19, 1118-1127.
- Kucia, M., Reca, R., Campbell, F. R., Zuba-Surma, E., Majka, M., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. Z.** (2006). A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 20, 857-869.

- Ladewig, J., Mertens, J., Kesavan, J., Doerr, J., Poppe, D., Glaue, F., Herms, S., Wernet, P., Kögler, G., Müller, F. J., Koch, P. and Brüstle, O.** (2012). Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat. Methods*, 9, 575-578.
- Lapidot, T., Dar, A. and Kollet, O.** (2005). How do stem cells find their way home? *Blood* 106, 1901-1910.
- Laskowski, A., Reiser, G. and Reymann, K. G.** (2007) Protease-activated receptor-1 induces generation of new microglia in the dentate gyrus of traumatised hippocampal slice cultures. *Neurosci. Lett.* 415, 17-21
- Lee, J., Elkahoul, A. G., Messina, S. A., Ferrari, N., Xi, D., Smith, C. L., Cooper, R., Albert, P. S. and Fine, H. A.** (2003). Cellular and genetic characterization of human adult bone marrow-derived neural stem-like cells: a potential antiglioma cellular vector. *Cancer research* 63, 8877-8889.
- Loutit, J. F., Marshall, M. J., Nisbet, N. W. and Vaughan, J. M.** (1982). Versatile stem cells in bone marrow. *Lancet*. 2, 1090-1093.
- Lu, P., Blesch, A. and Tuszynski, M. H.** (2004). Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J. Neurosci. Res.* 77, 174-191.
- Lu, F. and Wong, C. S.** (2005). A clonogenic survival assay of neural stem cells in rat spinal cord after exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 163, 63-71.
- Mahmood, A., Lu, D. and Chopp, M.** (2004). Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*. 21, 33-39
- Martin, G. R.** (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 7634-7638.
- Mets, T. and Verdonk, G.** (1981). In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mech. Ageing Dev.* 16, 81-89.
- Morikawa, S., Mabuchi, Y., Kubota, Y., Nagai, Y., Niibe, K., Hiratsu, E., Suzuki, S., Miyauchi-Hara, C., Nagoshi, N., Sunabori, T., Shimmura, S., Miyawaki, A., Nakagawa, T., Suda, T., Okano, H. and Matsuzaki Y.** (2009). Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J. Exp. Med.* 206, 2483-2496.
- Motaln, H., Schichor, C. and Lah, T. T.** (2010). Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer* 116, 2519-2530.
- Munoz-Elias, G., Woodbury, D. and Black, I. B.** (2003). Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. *Stem cells* 21, 437-448.
- Neuhuber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A. and Fischer, I.** (2004). Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J. Neurosci. Res.* 77, 192-204.

- Okano, H.** (2002). Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *Keio J. Med.* 51, 115-128.
- Omori, Y., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Houkin, K., Kocsis, J. D.** (2008). Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res.* 1236, 30-38.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. and Anversa, P.** (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705.
- Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhäuser, M. and Werner, C.** (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22, 377-384.
- Owen, M. and Friedenstein, A. J.** (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* 136, 42-60.
- Park, H. E., Kim, D., Koh, H. S., Cho, S., Sung, J. S. and Kim, J. Y.** (2011). Real-Time Monitoring of Neural Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Electric Cell-Substrate Impedance Sensing. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, Article ID 485173
- Pereira, R. F., Halford, K. W., O'Hara, M. D., Leeper, D. B., Sokolov, B. P., Pollard, M. D., Bagasra, O. and Prockop, D. J.** (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4857-4861.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. and Goff, J. P.** (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.
- Pittenger, M. F., Alastair, M. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R.** (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Pozniak, C. D. and Pleasure, S. J.** (2006). Genetic control of hippocampal neurogenesis. *Genome Biology* 7, 207.1-207.4
- Qu, R., Li, Y., Gao, Q., Shen, L., Zhang, J., Liu, Z., Chen, X. and Chopp, M.** (2007). Neurotrophic and growth factor gene expression profiling of mouse bone marrow stromal cells induced by ischemic brain extracts. *Neuropathology* 27, 355-363.
- Ratajczak, M. Z., Kucia, M., Reza, R., Majka, M., Janowska-Wieczorek, A. and Ratajczak, J.** (2004). Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 18, 29-40.
- Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L. and Verfaillie, C. M.** (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98, 2615-2625.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S.** (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.

- Rivera, F. J., Couillard-Despres, S., Pedre, X., Ploetz, S., Caioni, M., Lois, C., Bogdahn, U. and Aigner, L.** (2006) Mesenchymal Stem Cells Instruct Oligodendrogenic Fate Decision on Adult Neural Stem Cells. *Stem Cells* 10, 2209-2219
- Rivera, F. J., Siebzehnruhl, F. A., Kandasamy, M., Couillard-Despres, S., Caioni, M., Poehler, A. M., Berninger, B., Sandner, B., Bogdahn, U., Goetz, M., Bluemcke, I., Weidner, N. and Aigner L.** (2009). Mesenchymal stem cells promote oligodendroglial differentiation in hippocampal slice cultures. *Cell. Physiol. Biochem.* 24, 317-324.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R. and Sanberg, P. R.** (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* 164, 247-256
- Sauerzweig, S., Munsch, T., Lessmann, V., Reymann, K. G., Braun, H.** (2009a). A population of serum deprivation-induced bone marrow stem cells (SD-BMSC) expresses marker typical for embryonic and neural stem cells. *Exp Cell Res.* 315, 50-66
- Sauerzweig, S., Baldauf, K., Braun, H. and Reymann, K. G.** (2009b) Time-dependent segmentation of BrdU-signal leads to late detection problems in studies using BrdU as cell label or proliferation marker. *J. Neurosci. Methods.* 177, 149-159.
- Schmidt, W. and Reymann, K. G.** (2002). Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 334, 153-156.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S. and Weissman, I. L.** (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.
- Sharma, A. K., Bury, M. I., Marks, A. J., Fuller, N. J., Meisner, J. W., Tapaskar, N., Halliday, L. C., Matoka, D. J. and Cheng, E. Y.** (2011). A nonhuman primate model for urinary bladder regeneration using autologous sources of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 29, 241-250.
- Shichinohe, H., Kuroda, S., Yano, S., Hida, K. und Iwasaki, Y.** (2007). Role of SDF-1/CXCR4 system in survival and migration of bone marrow stromal cells after transplantation into mice cerebral infarct. *Brain Res.* 1183, 138-147.
- Storch, A., Paul, G., Csete, M., Boehm, B. O., Carvey, P. M., Kupsch, A. and Schwarz, J.** (2001). Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp. Neurol.* 170, 317-325.
- Suzuki, H., Taguchi, T., Tanaka, H., Kataoka, H., Li, Z., Muramatsu, K., Gondo, T. and Kawai, S.** (2004). Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 918-922.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S.** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka S.** (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Taylor, G., Lehrer, M. S., Jensen, P. J., Sun, T. T. and Lavker, R. M.** (2000). Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102, 451-461.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E. and Scott, E. W.** (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M.** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Thorgeirsson, S. S., Evarts, R. P., Bisgaard, H. C., Fujio, K. and Hu, Z.** (1993). Hepatic stem cell compartment: activation and lineage commitment. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204, 253-260.
- Vescovi, A. L., Reynolds, B. A., Fraser, D. D. and Weiss, S.** (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11, 951-966.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C. and Wernig M.** (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035-1041.
- Wagers, A. J. and Weissman, I. L.** (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116, 639-648.
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A. C. and Reynolds, B. A.** (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci.* 16, 7599-7609.
- Wen, J., Zhang, J. Q., Huang, W. and Wang, Y.** (2012). SDF-1 α and CXCR4 as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 2, 20-28
- Wislet-Gendebien, S., Leprince, P., Moonen, G. and Rogister, B.** (2003). Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* 116, 3295-3302.
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. and Black, I. B.** (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61, 364-370.
- Woodbury, D., Reynolds, K. and Black, I. B.** (2002). Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* 69, 908-917.
- Yamanaka, S.** (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 39-49.

- Yang, N., Zuchero, J. B., Ahlenius, H., Marro, S., Ng, Y. H., Vierbuchen, T., Hawkins, J. S., Geissler, R., Barres, B. A. and Wernig, M.** (2013). Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion. *Nat. Biotechnol.* 31, 434-439.
- Yang, Q., Mu, J., Li, Q., Li, A., Zeng, Z., Yang, J., Zhang, X., Tang, J. and Xie, P.** (2008). A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 520-524.
- Yang, Z. and Levison, S. W.** (2006). Hypoxia/ischemia expands the regenerative capacity of progenitors in the perinatal subventricular zone. *Neuroscience* 139, 555–564.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P. and Smith, A. G.** (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I. and Thomson, J.A.** (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Yu, X., Chen, D., Zhang, Y., Wu, X., Huang, Z., Zhou, H., Zhang, Y. and Zhang, Z.** (2012). Overexpression of CXCR4 in mesenchymal stem cells promotes migration, neuroprotection and angiogenesis in a rat model of stroke. *J. Neurol. Sci.* 316, 141-149.
- Zappia, E., Casazza, S. and Pedemonte, E.** (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T cell anergy. *Blood* 106, 1755–1761.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. and Hedrick, M. H.** (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* 7, 211-228.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aqua dest.	destilliertes Wasser
BDNF	vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (engl. <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
BHA	Butylhydroxyanisol
BME	β-Mercaptoethanol
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
CD	Unterscheidungsgruppen (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	Komplementäre DNA
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCX	<i>doublecortin</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E18	Embryonaltag 18
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	endothelialer Wachstumsfaktor (engl. <i>endothelial growth factor</i>)
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
et al.	<i>et alii</i>
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (engl. <i>fibroblastic growth factor</i>)
FKS	fötales Kälberserum
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HGF	humaner Wachstumsfaktor (engl. <i>human growth factor</i>)
hMSZ	humane mesenchymale Stammzellen
HRG	Heregulin
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
iPS Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
Klf4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
MAPC	multipotente adulte Progenitorzellen

MIAMI Zellen	<i>marrow-isolated adult multilineage inducible cells</i>
min	Minute
MSZ	mesenchymale Stammzellen
NB	Neurobasal A
NDM CET	Neurogenes Differenzierungsmedium der Firma <i>cellular engineering technology</i>
NDM PC	Neurogenes Differenzierungsmedium der Firma <i>Promocell</i>
NeuN	<i>neuron-specific nuclear protein</i>
NF-M	<i>Neurofilament M</i>
NSE	<i>neuron specific enolase</i>
NSZ	neurale Stammzellen
Oct4	<i>octamer binding transcription factor 4</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PKZ	Primärkulturzellen
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
Rex-1	<i>restricted expression 1</i>
rMSZ	Mesenchymale Stammzellen aus der Ratte
RNS	Ribonukleinsäure
SDF1	<i>stromal derived factor 1</i>
SGZ	Subgranulärzone
SOX2	<i>SRY-related HMG BOX gene 2</i>
SVZ	Subventrikulärzone
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VSEL-Zellen	<i>very small embryonic like stem cells</i>
v/v	Volumen pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung	Titel	Seite
Abbildung 1.1	Stammzellen können sich auf zwei Arten teilen	1
Abbildung 1.2	Differenzierung neuraler Stammzellen	4
Abbildung 1.3	Zonen der Neurogenese im adulten Säugerhirn	5
Abbildung 1.4	<i>in vitro</i> Assay der Neurosphärlenbildung	7
Abbildung 2.1	Schematische Darstellung des Kokultivierungsexperimentes	27
Abbildung 2.2	Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs	31
Abbildung 3.1	Isolierung und Kultivierung von mesenchymalen Knochenmarkstammzellen aus dem Knochenmark von Ratten	34
Abbildung 3.2	Kultivierung von humanen mesenchymalen Knochenmarkstammzellen	36
Abbildung 3.3	Bioreaktoren mit 1 Million rMSZ, hMSZ und E18-PKZ	37
Abbildung 3.4	Induktion von Neurosphärlen	38
Abbildung 3.5	Expression neuroektodermaler Marker in basalen rMSZ	39
Abbildung 3.6	Expression neuroektodermaler Marker in basalen hMSZ	40
Abbildung 3.7	Expression neuroektodermaler Marker in basalen E18-PKZ	42
Abbildung 3.8	Expression neuroektodermaler Marker in basalen rMSZ-Neurosphärlen	43
Abbildung 3.9	Expression neuroektodermaler Marker in basalen hMSZ-Neurosphärlen	44
Abbildung 3.10	Expression neuroektodermaler Marker in basalen E18-Neurosphärlen	46
Abbildung 3.11	Inkubation der rMSZ mit dem neurogenen Differenzierungsmedium NDM CET	48
Abbildung 3.12	Inkubation der rMSZ mit dem neurogenen Differenzierungsmedium NDM PC	49
Abbildung 3.13	Inkubation von hMSZ mit dem neurogenen Differenzierungsmedium NDM CET	50
Abbildung 3.14	Inkubation von hMSZ mit dem neurogenen Differenzierungsmedium NDM PC	51
Abbildung 3.15	Nachweis neuroektodermaler Proteine nach Inkubation der rMSZ mit NDM CET	52
Abbildung 3.16	Nachweis neuroektodermaler Proteine nach Inkubation der rMSZ mit NDM PC	53
Abbildung 3.17	Immunzytochemischer Nachweis neuroektodermaler Proteine nach Inkubation der hMSZ mit NDM CET	54

Abbildung 3.18	Immunzytochemischer Nachweis neuroektodermaler Proteine nach Inkubation der hMSZ mit NDM PC	55
Abbildung 3.19	Video-Mikroskopie von rMSZ unter basalen Kulturbedingungen über einen Zeitraum von 19 h	56
Abbildung 3.20	Video-Mikroskopie von rMSZ unter Einfluss von NDM CET über einen Zeitraum von 11 h	57
Abbildung 3.21	Video-Mikroskopie von rMSZ unter Einfluss von NDM PC über einen Zeitraum von 2 h	58
Abbildung 3.22	Video-Mikroskopie von hMSZ unter basalen Kulturbedingungen über einen Zeitraum von 18 h	59
Abbildung 3.23	Video-Mikroskopie von hMSZ unter Einfluss von NDM CET über einen Zeitraum von 18 h	60
Abbildung 3.24	Video-Mikroskopie von hMSZ unter Einfluss von NDM PC über einen Zeitraum von 18 h	61
Abbildung 3.25	Induktion von Neurosphärulen aus rMSZ mit NDM CET	63
Abbildung 3.26	Expression neuroektodermaler Marker in rMSZ-Sphärulen nach Induktion in NDM CET	64
Abbildung 3.27	Induktion von Neurosphärulen aus rMSZ mit NDM PC	65
Abbildung 3.28	Expression neuroektodermaler Marker in rMSZ-Sphärulen nach Induktion in NDM PC	66
Abbildung 3.29	Video-Mikroskopie von rMSZ-Sphärulen unter basalen Kulturbedingungen in rMSZ-Sphärulen-Standardmedium über einen Zeitraum von 18,5 h	68
Abbildung 3.30	Video-Mikroskopie von rMSZ-Sphärulen unter Einfluss von NDM CET über einen Zeitraum von 18,5 h	69
Abbildung 3.31	Kokultivierung von E18-PKZ und rMSZ für 24 h	71
Abbildung 3.32	Nestin- und NG2-positive rMSZ nach Kokultivierung mit E18-PKZ für 48 h	72
Abbildung 3.33	Kokultivierung von E18-PKZ und rMSZ	73
Abbildung 3.34	Ko-Expression von β III Tubulin und DCX in ausgesäten rMSZ-Sphärulen	75
Abbildung 3.35	Expression von Nestin und β III Tubulin in ausgesäten rMSZ-Sphärulen	76
Abbildung 3.36	Auswachsende Neurosphärulen einer kortikalen Primärkultur	77
Abbildung 3.37	rMSZ unter verschiedenen Kulturbedingungen	78
Abbildung 3.38	Quantitative RT-PCR mittels LightCycler PCR	80
Abbildung 4.1	Vergleich von MSZ aus der Ratte mit humanen MSZ	84
Abbildung 4.2	Differenzierung der MSZ durch neurogene Differenzierungsmedien	91

10 PUBLIKATIONEN

Ginsburg-Shmuel, T., Haas, M., **Schumann, M.**, Reiser, G., Kalid, O., Stern, N. and Fischer, B. (2010). 5-OMe-UDP is a potent and selective P2Y(6)-receptor agonist. *J. Med. Chem.* 53, 1673-1685

Vorträge

Fibril-induced Neurotoxicity?!, 3rd Symposium of the International Alzheimer Ph.D. Graduate School (NEURAD), 18. – 21. September 2009, Lille, Frankreich

Posterpräsentationen

Nucleation-dependent aggregation of A β is required for neuronal cell death, 8. Jahrestagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, 25. – 29. März 2009, Göttingen, Deutschland

New sub-population of bone marrow stem cells expressing embryonic and neural markers, 6th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair, 1. – 4. Oktober 2010, Rostock, Deutschland

11 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

Mesenchymale Stammzellen und ihr Differenzierungspotential

**- Untersuchungen von *in vitro* Wachstumsbedingungen
zur Anreicherung mesenchymaler Subpopulationen -**

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum humanarum (Dr. rer. hum.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Rostock, den 27.10.2014